

# RIOOLWATERSURVEILLANCE ROTTERDAM-RIJNMOND ONDERZOEKSRESULTATEN SEPTEMBER 2020-MAART 2022



RAPPORT

2023  
03

RIOOLWATERSURVEILLANCE ROTTERDAM-RIJNMOND  
ONDERZOEKSRESULTATEN SEPTEMBER 2020-MAART 2022

RAPPORT

2023

03

ISBN 978.94.6479.002.3



# COLOFON

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer  
Postbus 2180  
3800 CD Amersfoort

AUTEURS J.G. Langeveld  
R.P.S. Schilperoort  
J.A.B. Post  
G.J. Medema

## BEGELEIDINGSCOMMISSIE

Nick Ivens; Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard  
Olaf Duin; Waterschap Hollandse Delta  
Mariska Ronteltap; Hoogheemraadschap Delfland  
Ton Beenen; Stichting RIONED  
Bert Palsma; STOWA

DRUK Buro Vormvast  
STOWA STOWA 2023-03  
ISBN 978.94.6479.002.3

Copyright Teksten en figuren uit dit rapport mogen alleen worden overgenomen met bronvermelding.  
Disclaimer Deze uitgave is met de grootst mogelijke zorg samengesteld. Niettemin aanvaarden de auteurs en de uitgever geen enkele aansprakelijkheid voor mogelijke onjuistheden of eventuele gevolgen door toepassing van de inhoud van dit rapport.

# VERANTWOORDING

Dit onderzoek is gestart als een samenwerking tussen de gezondheidssector met Erasmus Medical Center, GGD Rotterdam Rijnmond en huisartsenpraktijken in de regio Rijnmond en de watersector met STOWA, Waterschap Hollandse Delta, Hoogheemraadschap Delfland en Hoogheemraadschap Schieland en Krimpenerwaard, Partners4UrbanWater, RoyalHaskoningDHV en KWR. De financiering van dit onderzoek kwam van de Erasmus Foundation, Adessium Foundation, het EU VEO project en van het Ministerie van VWS voor de gezondheidspartners, en van STOWA, de waterschappen en de Topsector Watertechnologie voor de waterpartners, later aangevuld met financiering via de GGD Rotterdam Rijnmond.

Inbreng vanuit het RIVM in deze samenwerking werd vormgegeven door deelname van Eelco Franz, Roan Pijnacker en Christian Carrizosa Balmont aan de voortgangsoverleggen van dit onderzoek. Erasmus MC heeft een eigen rapportage opgesteld voor de financiers van het gezondheidsdeel van dit onderzoek. RoyalHaskoningDHV heeft een rapportage opgesteld over het onderzoeksdeel naar de relatie tussen rioolwaterdata, teststraatdata en socioeconomische status en mobiliteit wat zij hebben uitgevoerd.

De auteurs zijn zeer dankbaar voor alle bijdragen die de medewerkers van de projectpartners en daarbuiten hebben geleverd in de bijzondere tijd van de COVID-19 pandemie.

## **Erasmus MC**

*Afdeling Viroscience:* M.P.G. Koopmans, M. De Graaf, B. Oude Munnink, R. Izquierdo Lara, C.E.M. Schapendonk

*Afdeling Huisartsengeneeskunde:* P. Bindels, E.I.T. De Schepper, T. Mulder-van Kempen, E. Hoogteijling, L. van Kooten

*Afdeling Medische Informatica:* J. van der Lei

*Afdeling Medische Microbiologie en infectieziekten:* M. Vos

**Deense Technische Universiteit (DTU):** F Aarestrup

**GGD Rotterdam Rijnmond:** E. Fanoy, J. van Beek, R. Vriend

**RIVM:** E. Franz, R. Pijnacker, C. Carrizosa Balmont

**Huisartsenpraktijken Rijnmond Gezond**

**Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer:** A.J. Palsma, E.J.T.M. Leenen

**Waterschap Hollandse Delta:** O. Duin

**Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard:** N. Ivens

**Hoogheemraadschap van Delfland:** M. Ronteltap

**Partners4UrbanWater:** J.G. Langeveld, R.P.S. Schilperoort, J.A.B. Post

**Royal Haskoning DHV:** E. Weisbord, S. Stubbé

**KWR Water Research Institute:** L. Heijnen, G. Elsinga, R. Italiaander, D. van der Linde, A. Brouwer, A. van der Veen, N. Slaats, L. Borstlap, F. Been, G.J. Medema

**IMD:**S. Holsteijn

**AQUON:** R. Sonneveld

De aanpak en resultaten van de in hoofdstuk 3 opgenomen rioolwatersurveillance zijn ook open access onder de Creative Commons CC-BY Licence gepubliceerd in twee wetenschappelijke artikelen:

Langeveld, J., Schilperoort, R., Heijnen, L., Elsinga, G., Schapendonk, C. E., Fanoy, E., Schepper, E.I.T., Koopmans, M.P.G., Graaf, M. de & Medema, G. (2023). Normalisation of SARS-CoV-2 concentrations in wastewater: The use of flow, electrical conductivity and crAssphage. *Science of the Total Environment*, 865, 161196.

de Graaf, M., Langeveld, J., Post, J., Carrizosa, C., Franz, E., Izquierdo-Lara, R. W., Elsinga, G., Heijnen, L., Been, F., Beek, J. van, Schilperoort, R., Vriend, R., Fanoy, E., Schepper, E.I.T.de, Koopmans, M.P.G.& Medema, G. (2023). Capturing the SARS-CoV-2 infection pyramid within the municipality of Rotterdam using longitudinal sewage surveillance. *Science of the Total Environment*, 883, 163599.

# TEN GELEIDE

**De samenwerking tussen de afvalwater- en de gezondheidssector is bepalend voor de interpretatie van het COVID19 virus in rioolwater.**

In Nederland is het eerste geval van COVID19, veroorzaakt door het SARS-CoV-2 virus, op 27 februari 2020 vastgesteld. Kort daarna, al op 5 maart 2020, heeft KWR in monsters van rioolwater SARS-CoV-2 aangetroffen (Medema et al., 2020a). Het RIVM is half februari 2020 begonnen met het onderzoeken van de aanwezigheid van SARS-CoV-2 in rioolwater en ook zij troffen dit vanaf begin maart aan. Het RIVM heeft de metingen vervolgens doorontwikkeld tot de Nationale Rioolwater Surveillance (NRS), waarbinnen sinds september 2020 het influent van alle RWZIs in Nederland wordt gemonitord. De gezamenlijke Waterschappen hebben -met financiële steun van het ministerie van VWS - de bemonsteringsinfrastructuur in een zeer korte tijd op poten gezet en de bemonstering en logistiek opgezet en verbeterd.

De monitoring van het virus via het rioolwater bleek een succes, iedereen gaat immers naar de wc, maar niet iedereen laat zich testen.

Bij het RIVM lag en ligt de focus op de nationale rioolwatersurveillance. Bij het hier gerapporteerde onderzoek lag de focus op het doorontwikkelen van het algemene concept van 'wastewater based epidemiology' voor het volgen en analyseren van de ontwikkeling van SARS-CoV-2 in de samenleving door middel van rioolwater surveillance. Belangrijk resultaat hierbij is de "normalisatie" van de gegevens. De toename of afname van het aantal virusdeeltjes in afvalwater wordt niet alleen veroorzaakt door meer of minder patiënten, maar ook door meer of minder rioolwater. Dit onderzoek heeft laten zien dat een goede normalisatie bepalend is voor de kwaliteit van de gegevens. Inmiddels heeft deze "Nederlandse aanpak" Europese en zelfs internationale (WHO) navolging gekregen.

Een goede interactie tussen de afvalwaterwereld en de gezondheidswereld is van wezenlijk belang gebleken voor een valide interpretatie van de gegevens en dus voor de samenleving. Wij hopen dat deze samenwerking bestendig zal worden. Het zou een grote misser zijn indien Rioolwatersurveillance plaats zou vinden zonder de kundige inzet van rioleurs.

Joost Buntsma  
Directeur STOWA

# DE STOWA IN HET KORT

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

STOWA werkt in hoge mate vraaggestuurd. We inventariseren nauwgezet welke kennisvragen waterschappen hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers. Het initiatief daarvoor ligt veelal bij de kennisvragende waterbeheerders, maar soms ook bij kennisinstellingen en het bedrijfsleven. Dit tweerichtingsverkeer stimuleert vernieuwing en innovatie.

Vraaggestuurd werken betekent ook dat we zelf voortdurend op zoek zijn naar de 'kennisvragen van morgen' – de vragen die we graag op de agenda zetten nog voordat iemand ze gesteld heeft – om optimaal voorbereid te zijn op de toekomst.

STOWA ontzorgt de waterbeheerders. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van de gezamenlijke kennisprojecten op ons. Wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de juiste kennisvragen worden beantwoord. De projecten worden begeleid door commissies waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoeklijnen worden per werkveld uitgezet en verantwoord door speciale programmacommissies. Ook hierin hebben de regionale waterbeheerders zitting.

STOWA verbindt niet alleen kennisvragers en kennisleveranciers, maar ook de regionale waterbeheerders onderling. Door de samenwerking van de waterbeheerders binnen STOWA zijn zij samen verantwoordelijk voor de programmering, zetten zij gezamenlijk de koers uit, worden meerdere waterschappen bij één en het zelfde onderzoek betrokken en komen de resultaten sneller ten goede aan alle waterschappen.

De grondbeginselen van STOWA zijn verwoord in onze missie:

*Het samen met regionale waterbeheerders definiëren van hun kennisbehoeften op het gebied van het waterbeheer en het voor én met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.*

# RIOOLWATERSURVEILLANCE ROTTERDAM-RIJNMOND

## INHOUDSOPGAVE

	TEN GELEIDE	
	STOWA IN HET KORT	
<b>1</b>	<b>INLEIDING</b>	<b>1</b>
	1.1 Aanleiding	1
	1.2 Doelstelling en afbakening	2
	1.3 Leeswijzer	3
<b>2</b>	<b>DEEL I. IS RIOOLWATER EEN BRON VAN BESMETTING VOOR SARS-COV-2?</b>	<b>4</b>
	2.1 Is SARS-CoV-2 in ontlasting en rioolwater in staat ziekte te veroorzaken?	4
	2.1.1 Aanwezigheid SARS-CoV-2 in ontlasting	4
	2.1.2 Infectieus SARS-CoV-2 in rioolwater	5
	2.2 Hoe lang blijft SARS-CoV-2 RNA aanwezig in rioolwater?	6
	2.3 Wat is de verwijdering SARS-CoV-2 RNA in de rioolwaterzuivering?	8
<b>3</b>	<b>DEEL II. RIOOLWATERSURVEILLANCE</b>	<b>10</b>
	3.1 Achtergrond rioolwatersurveillance	10
	3.2 Methode en aanpak onderzoek	12
	3.2.1 Locatiekeuze en beschrijving cases	12
	3.2.2 Meetopzet en bemonstering	13
	3.2.3 Laboratoriumanalyse	14
	3.2.4 Kwaliteitsborging en normalisatie	15
	3.2.5 Trendanalyse	17
	3.3 Resultaten	17
	3.3.1 Normalisatie op basis van debiet	17
	3.3.2 Vergelijking methodes voor normalisatie	18
	3.3.3 Borging data kwaliteit door normalisatie	21
	3.3.4 Controle op aantallen uitscheiders met behulp van crAssphage	23



<b>3.4</b>	<b>Trendanalyse</b>	<b>26</b>
3.4.1	Trendanalyse begin 2 <sup>e</sup> COVID-19 golf: september en oktober 2020	26
3.4.2	Trendanalyse 2 <sup>e</sup> COVID19 golf: september tot december 2020	27
3.4.3	Trendanalyse Alfa variant: januari 2021-juni 2021	31
3.4.4	Trendanalyse Delta variant: juli 2021-november 2021	33
3.4.5	Trendanalyse Omikron variant: december 2021-maart 2022	36
3.4.6	Trendanalyse: huisartsenbezoeken	38
3.4.7	Trendanalyse: ziekenhuisopnames	39
<b>4</b>	<b>CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN</b>	<b>41</b>
4.1	Deel I. Is rioolwater een bron van besmetting voor SARS-VoV-2?	41
4.2	Deel II. Rioolwatersurveillance	41
4.3	Aanbevelingen	43
<b>5</b>	<b>REFERENTIES</b>	<b>44</b>
BIJLAGE I	NORMALISATIE SARS-COV-2	52
BIJLAGE II	CRASSPHAGE VRACHT PER PERSOON PER DAG	57
BIJLAGE III	TIJDLIJN MAATREGELEN COVID	62

# 1

## INLEIDING

### 1.1 AANLEIDING

In december 2019 begon in Wuhan, China, de uitbraak van het coronavirus respiratory disease, ofwel COVID19, veroorzaakt door een nieuw virus: SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2). Deze uitbraak heeft uiteindelijk geleid tot de pandemie die nog steeds (zomer 2022) bezig is. In Nederland is het eerste geval op 27 februari 2020 vastgesteld. Kort daarna, al op 5 maart 2020, heeft KWR in monsters van rioolwater SARS-CoV-2 aangetroffen (Medema et al., 2020a). Het RIVM is half februari 2020 begonnen met het onderzoeken van de aanwezigheid van SARS-CoV-2 in rioolwater en ook zij troffen dit vanaf begin maart aan. Het RIVM heeft de metingen vervolgens doorontwikkeld tot de Nationale Rioolwater Surveillance (NRS), waarin sinds september 2020 het influent van alle RWZIs in Nederland wordt gemonitord.

De aanwezigheid van SARS-CoV-2 in rioolwater riep verschillende vragen op. De eerste vraag was of het rioolwater ook een bron van besmetting zou kunnen vormen. Deze vraag is zeer relevant voor mensen die beroepsmatig in contact kunnen komen met rioolwater, zoals medewerkers van gemeenten en reinigings- en inspectiebedrijven en medewerkers van waterschappen die werkzaam zijn op de rwzi's. De tweede vraag was of rioolwater surveillance een geschikt instrument is om de ontwikkeling van de COVID19 in de populatie te volgen. Bij deze vraag komt een aantal ontwikkelingen bij elkaar: de recente snelle ontwikkeling van meettechnologie, waardoor het steeds beter mogelijk is om ziekteverwekkers aan te tonen in lastige matrices als rioolwater, het in de wetenschap inmiddels goed beschreven basisconcept van 'wastewater based epidemiology' en de ontwikkeling van resource recovery, waarbij waterschappen zo veel mogelijk waarde willen creëren van afvalwater. Deze waarde creatie kan daarbij lopen over de vier sporen van het I-NEW concept: Informatie, Nutriënten, Energie en Water. Afvalwater als bron van Informatie, of mooier gezegd, als spiegel van de samenleving, is het meest recente spoor in de waarde creatie.

De twee genoemde vragen stonden centraal in het projectvoorstel dat KWR in mei 2020 heeft ingediend bij TKI Watertechnologie. Het project, dat mede mogelijk is gemaakt door de financiële en in kind bijdragen van STOWA, Hoogheemraadschap Delfland, Waterschap Hollandse Delta, Hoogheemraadschap Schieland en de Krimpenerwaard, Partners4UrbanWater en Royal HaskoningDHV, sloot aan op parallel onderzoek van ErasmusMC, gefinancierd door de ErasmusFoundation. Dit heeft geresulteerd in de vorming van een onderzoeksconsortium bestaande uit KWR, ErasmusMC, Partners4UrbanWater, GGD Rotterdam-Rijnmond en Royal HaskoningDHV, dat vanaf eind augustus 2020 aan de slag is gegaan om de onderzoeksvragen te beantwoorden. Het onderzoek is dankzij aanvullende financiering van STOWA, GGD Rotterdam-Rijnmond, ErasmusMC en de TKI Watertechnologie een aantal keer verlengd en in maart 2022 beëindigd.

## 1.2 DOELSTELLING EN AFBAKENING

De eerste doelstelling van het onderzoek is het verkrijgen van inzicht in de besmettelijkheid van SARS-CoV-2 via rioolwater. Bij aanvang van dit project waren wereldwijd diverse onderzoeksgroepen bezig om hierin inzicht te krijgen, waardoor deze doelstelling ingevuld is door gebruik te maken van de meest recente internationale onderzoeksresultaten.

De tweede doelstelling van het onderzoek is het doorontwikkelen van het algemene concept van 'wastewater based epidemiology' voor het door middel van rioolwater surveillance volgen en analyseren van de ontwikkeling van SARS-CoV-2 in de samenleving.

De basisgedachte achter de opzet van het onderzoek was de zogenaamde 'infectie pyramide', zie figuur 1.1. De top van de pyramide omvat de mensen die zijn opgenomen in het ziekenhuis, de laag daaronder mensen die zijn gediagnosticeerd door een huisarts, de laag daaronder mensen die zijn geregistreerd in een gezondheidssysteem, bijvoorbeeld via positieve testen in een teststraat, de laag daaronder zijn mensen die symptomen ervaren en de laag daaronder bevat daarnaast ook de asymptomatische groep mensen. De drie bovenste lagen zijn te volgen door goede registraties door GGD, huisarts en ziekenhuizen, in dit project aangeduid als 'bovengrond', terwijl de onderste laag, het aantal dragers, gevolgd kan worden via 'wastewater based epidemiology', in dit project aangeduid als de 'ondergrond'. Al snel in de pandemie bleek dat veel transmissie van SARS-CoV-2 niet werd opgemerkt door de bovengrondse surveillance. In dit project is onderzocht hoe de gegevens uit verschillende bronnen en lagen van de pyramide elkaar ondersteunen. Bij de selectie van de meetlocaties is dan ook geprobeerd om zo veel mogelijk 'lagen' uit de pyramide te koppelen door op zoek te gaan naar locaties waar bemalingsgebieden van de riolering zo veel mogelijk overlappen met het verzorgingsgebied van een huisartsenpraktijk, en de teststraatdata via postcodegegevens te koppelen aan bemalingsgebieden.

FIGUUR 1.1 INFECTIE PYRAMIDE (NIEUWENHUIJSE & KOOPMANS, 2017)



Het onderzoek heeft een schat aan resultaten opgeleverd over de opzet en meerwaarde van rioolwateronderzoek en de koppeling van de rioolmetingen aan epidemiologische data, zoals aantal positieve testen, aantal huisartsenbezoeken, aantal ziekenhuisopnames en aantallen overleden personen. In dit STOWA rapport ligt de nadruk op de ontwikkelde methodes en technieken voor de rioolwater surveillance, de relatie met de aantallen positieve testen en de meerwaarde van riolwater surveillance voor de GGD.

### 1.3 LEESWIJZER

Dit rapport is opgedeeld in twee onderdelen. Deel I gaat in hoofdstuk 2.1 in op de besmettelijkheid van SARS-CoV-2 in rioolwater op basis van een inventarisatie van internationale literatuur en nog ongepubliceerde onderzoeksresultaten. Daarnaast gaat hoofdstuk 2.2 en 2.3 in op de vraag hoe lang SARS-CoV-2 in rioolwater aanwezig blijft en in hoeverre dit nog aanwezig is in het effluent van een rwzi. Deel II beschrijft in hoofdstuk 3 in detail de ervaringen met het opzetten en uitvoeren van de rioolwatersurveillance in Rotterdam-Rijnmond. Paragraaf 3.1 beschrijft de achtergronden en paragraaf 3.2 beschrijft de gevolgde methode en gekozen aanpak. De resultaten komen aan de orde in paragraaf 3.3, waarna in paragraaf 3.4 de trendanalyse wordt beschreven. Hoofdstuk 4 besluit met de conclusies en aanbevelingen.

# 2

## DEEL I. IS RIOOLWATER EEN BRON VAN BESMETTING VOOR SARS-COV-2?

Toen in het begin van de pandemie bekend werd dat RNA van SARS-CoV-2 in rioolwater aanwezig was, ontstond bezorgdheid over het risico op virusoverdracht via contact met rioolwater en met aerosolen en druppels rioolwater die gevormd worden bij allerlei handelingen en processen met rioolwater (rioolreiniging, actief slibinstallaties etc.). Die bezorgdheid uitte zich onder andere in het stopzetten van de monsternamen van rioolwater en van rioolreinigings-werkzaamheden waar druppelvorming optreedt. Al snel verschenen reacties van experts die de beschikbare kennis hadden geëvalueerd en concludeerden dat overdracht van COVID-19 via rioolwater erg onwaarschijnlijk is (Het Coronavirus & afvalwater. Projectdossier | STOWA). Belangrijk daarbij is dat de methode (PCR) die wordt gebruikt om SARS-CoV-2 in rioolwater te detecteren gebruik maakt van een klein stukje van het erfelijk materiaal van het virus, en dat bekend is voor veel virussen dat deze methode ook, en vaak heel veel meer, virusdeeltjes aantreft in rioolwater die zodanig beschadigd of onvolkomen zijn dat ze niet in staat zijn een nieuwe gastheer te besmetten.

In dit deel wordt de wereldwijde kennis over drie elementen samengevat:

1. Is SARS-CoV-2 in ontlasting en rioolwater nog infectieus en in staat ziekte te veroorzaken?
2. Hoe lang blijft SARS-CoV-2 (RNA) in rioolwater aanwezig?
3. Hoe goed wordt SARS-CoV-2 RNA verwijderd door de rioolwaterzuivering en wordt er in effluent nog SARS-CoV-2 RNA aangetroffen en vormt dat een risico voor bv zwemmers?

### 2.1 IS SARS-COV-2 IN ONTLASTING EN RIOOLWATER IN STAAT ZIEKTE TE VEROOZAKEN?

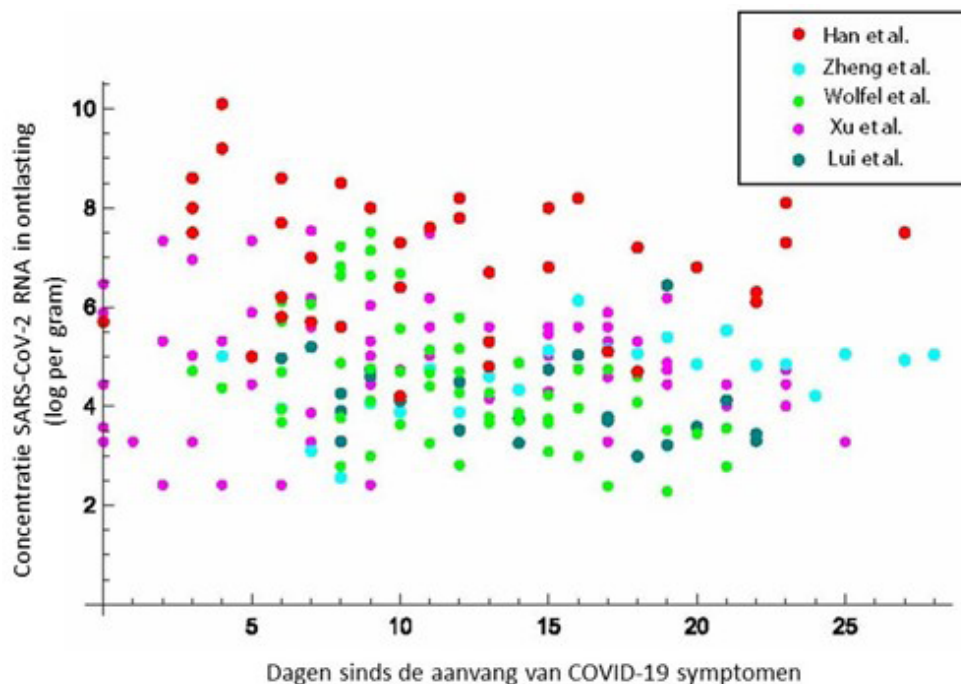
In het begin van de pandemie werd gerefereerd naar de uitbraak van SARS virus in 2003. Daar werd een uitbraak in de Amoy Gardens appartement-gebouwen in Hong Kong waar 300 mensen ziek werden waarschijnlijk veroorzaakt via druppels besmet rioolwater die via onvolkomenheden in de binneninstallatie van de gebouwen vrij kwamen (McKinney, Gong, and Lewis 2006). Een werkgroep van de WHO die deze uitbraak bestudeerde concludeerde destijds al dat dit een uitzonderlijke situatie was waar onverdund afvalwater van een besmet toilet in de lucht in badkamers van andere appartementen terecht kon komen, en dat communaal rioolwater geen waarschijnlijke verspreidingsroute is voor SARS. Ook voor SARS-CoV-2 wijzen sommigen er op dat deze route zou kunnen bestaan (Kang et al. 2020). Maar er zijn geen epidemiologische aanwijzingen dat rioolwater in of buiten gebouwen, of slib, of water in het algemeen enige rol hebben gespeeld bij de verspreiding van COVID-19, ondanks de wereldwijde en langdurige verspreiding van het virus (Sobsey 2021).

#### 2.1.1 AANWEZIGHEID SARS-COV-2 IN ONTLASTING

Een groot deel (ongeveer de helft) van de COVID-patiënten heeft symptomen die aangeven dat de ziekte ook de darmen treft, zoals diarree. In ontlasting van een groot deel van COVID-19 patiënten wordt, met de PCR methode, SARS-CoV-2 aangetroffen, tot in hele hoge concen-

traties ( $10^{8-10}$  per gram, Figuur 2.1 uit (Medema, Been, et al. 2020)). Uitscheiding van virus RNA via de ontlasting houdt ook lang aan, tot meerdere weken nadat de symptomen van COVID-19 al verdwenen zijn. Ook hebben darmcellen de receptor waarlangs het virus de infectie begint en geven diermodellen aan dat infectie van darmcellen plaatsvindt (Guo et al. 2021) en is infectie van darmcellen ook in patiënten aangetroffen (Xiao, Tang, et al. 2020; Zang et al. 2020; Lamers et al. 2020) (Das Adhikari et al. 2021). Maar het darmmilieu blijkt een omgeving waarin SARS-CoV-2 snel geïnactiveerd wordt (99% binnen 1 uur) (Zang et al. 2020). Een review uit 2020 gaf aan dat er van de 6 studies die hadden gekeken naar de aanwezigheid van infectieus virus in de ontlasting van COVID-19 patiënten, er 3 (Wölfel et al. 2020; Jeong et al. 2020; Kim et al. 2020) geen en 3 wel (Wang et al. 2020; Zhang et al. 2020; Xiao, Sun, et al. 2020) infectieus virus hadden aangetroffen. Maar degene die infectieus virus hadden aangetroffen, vonden dat in een klein deel van de patiënten en in lage concentraties, ondanks de hoge concentraties virus RNA in de ontlasting (Heneghan et al., 2021). Ook in latere studies is maar een enkele keer levend, infectieus SARS-CoV-2 in ontlasting aangetroffen ((Das Adhikari et al. 2021). In deze studie werd infectieus SARS-CoV-2 aangetroffen bij 3 patiënten waar de RNA concentratie in de ontlasting meer dan  $10^6$  per ml was. De meeste studies vonden geen infectieus virus in ontlasting, ondanks de hele hoge concentratie virus RNA in ontlasting (Pedersen et al. 2021; Cerrada-Romero et al. 2022).

**FIGUUR 2.1 DE AANGETOONDE CONCENTRATIES SARS-COV-2 RNA IN ONTLASTING VAN COVID-19 PATIËNTEN, UITGEZET TEGEN HET AANTAL DAGEN DAT IS VERSTREKEN TUSSEN HET ONTLASTINGSONDERZOEK EN DE EERSTE ZIEKTEDAG**



### 2.1.2 INFECTIEUS SARS-COV-2 IN RIOOLWATER

Er is een aantal studies waarin is geprobeerd om infectieus SARS-CoV-2 in rioolwater te kweken. Geen van deze studies heeft infectieus virus kunnen aantonen, ook niet bij de hoogst gemeten concentraties RNA in rioolwater ((Westhaus et al. 2021; Rimoldi et al. 2020); Gerba 2021)., Dus, ondanks dat het RNA van SARS-CoV-2 goed aantoonbaar is in rioolwater, is rioolwater geen bron van besmettingen:

1. Er zijn geen epidemiologische signalen die wijzen op verspreiding van COVID-19 via ontlasting of rioolwater
2. In ontlasting is meestal geen infectieus virus meer aan te tonen
3. Het milieu in de darm en riool resulteert in snel verlies van de infectiviteit van het virus
4. De concentratie in virus (RNA) in rioolwater is veel lager dan in speeksel en aerosolen.

Deze analyse komt overeen met die van andere onderzoekers die de informatie over (afwezigheid van) infectieus SARS-CoV-2 in ontlasting en rioolwater hebben onderzocht en concluderen dat overdracht van SARS-CoV-2 via rioolwater of oppervlaktewater heel onwaarschijnlijk is (Jones et al. 2020; Sobsey 2021; Ahmed et al. 2021; Albert et al. 2021). Er zijn wel studies die desondanks aannemen dat transmissie via water op zou kunnen treden, maar dat is dus onterecht.

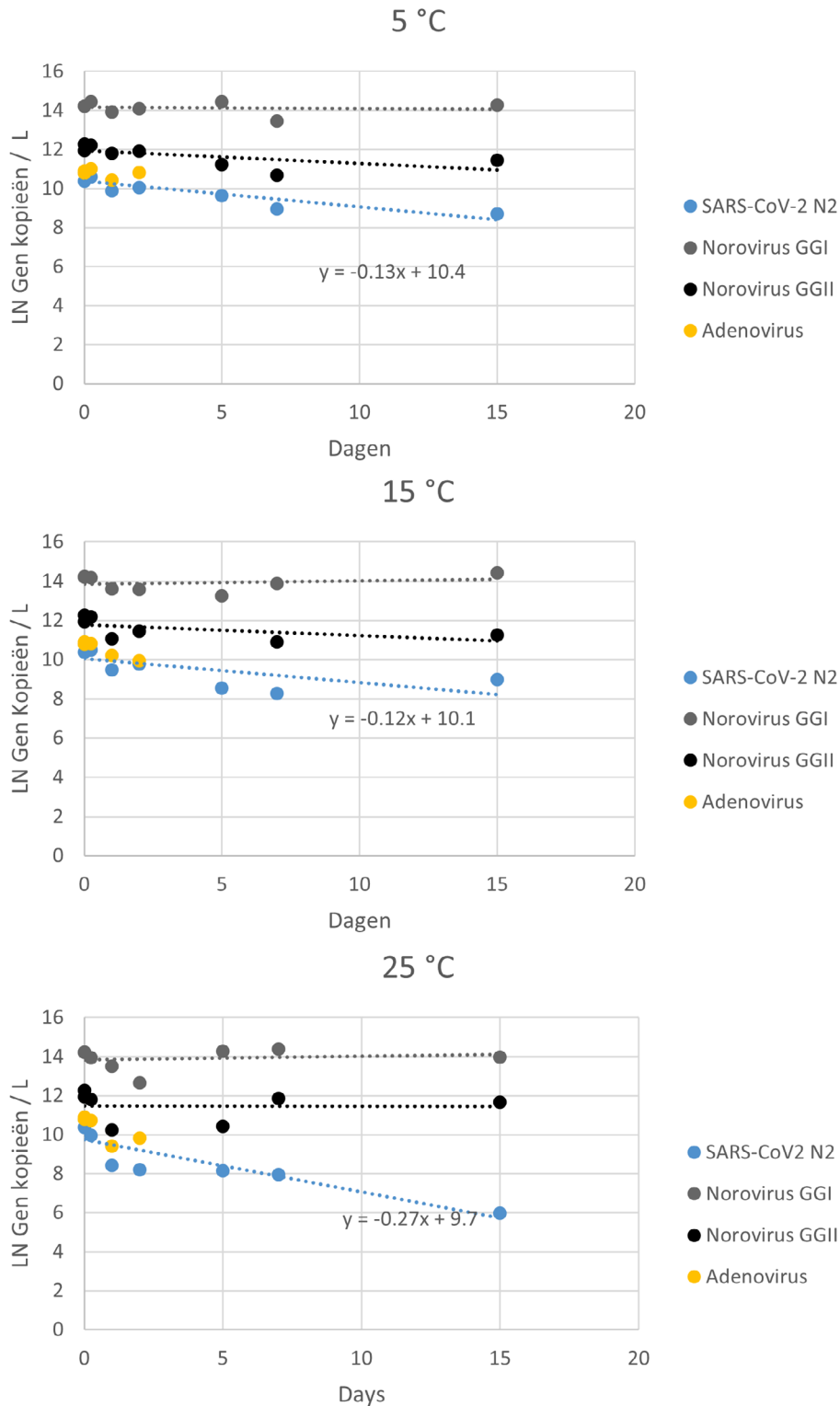
Het advies over persoonlijke bescherming en hygiëne blijft echter wel relevant, niet vanwege SARS-CoV-2 maar vanwege andere virussen in rioolwater (<https://www.stowa.nl/nieuws/coronavirus-rioolwater>).

## 2.2 HOE LANG BLIJFT SARS-COV-2 RNA AANWEZIG IN RIOOLWATER?

In de vorige paragraaf is aangegeven dat infectieus SARS-CoV-2 niet aangetroffen is in rioolwater en dat SARS-CoV-2 snel geïnactiveerd wordt in rioolwater. Voor rioolwater is dan wel de vraag hoe lang het virus RNA nog detecteerbaar blijft in rioolwater en of de concentratie snel afneemt. Er is onderzoek gedaan naar hoe lang het virus RNA detecteerbaar blijft in rioolwater onder verschillende omstandigheden. KWR heeft in het voorjaar van 2020 rioolwater bij verschillende temperaturen bewaard en over de tijd gevolgd hoe snel het RNA van SARS-CoV-2 verviel. Ter vergelijking zijn ook het RNA van Norovirus genogroep I en II en het DNA van Adenovirus 40/41 meegenomen. In figuur 2.2 is te zien dat het RNA van SARS-CoV-2 redelijk stabiel is in rioolwater bij 5 en 15°C en sneller afneemt bij 25°C. Norovirus RNA is stabiel in rioolwater. De eerste orde k-waarden zijn -0,122/-0,131 voor 5-15°C en -0,268 ln/dag voor 25°C. De tijd voor 90% reductie ( $T_{90}$ ) van het aantal RNA kopieën/ml is 17,6-18,8 dagen bij 5-15°C en 8,6 dag voor 25°C.

FIGUUR 2.2

KWR EXPERIMENTEN WAARIN RIOOLWATER BIJ VERSCHILLENDE TEMPERATUREN IS BEWAARD EN HET SARS-COV2 RNA, NOROVIRUS RNA VAN GENOGROEP I EN II EN VAN ADENOVIRUS DNA IS GEMETEN. UITGEZET IS HET NATUURLIJKE LOGARITME VAN DE CONCENTRATIE TEGEN DE TIJD

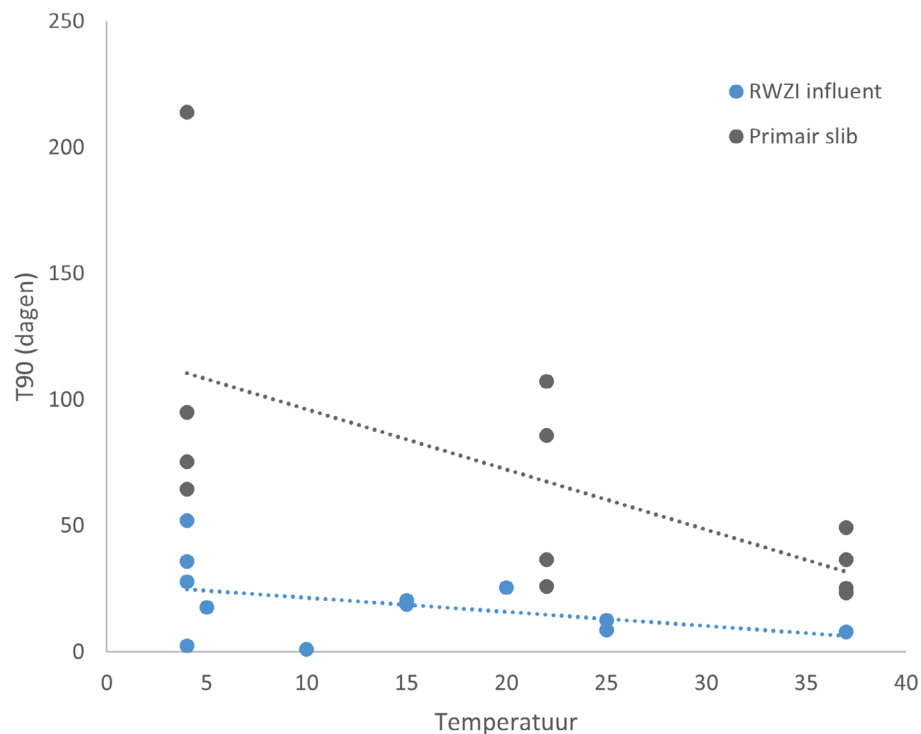


Ook in de literatuur zijn soortgelijke experimenten gerapporteerd. (Ahmed et al. 2020) heeft experimenten uitgevoerd met een gamma-bestraald lab-isolaat SARS-CoV-2 dat aan rioolwater is toegevoegd. Bij 4°C was de  $T_{90}$  27,8 dagen, bij 15°C 20,4 dagen en bij 25°C 12,6 dagen. (Bivins et al. 2020) deed proeven met infectieus SARS-CoV-2, daar was de  $T_{90}$



bij 20°C 1,6-2,1 dagen. De infectiviteit gaat dus veel sneller verloren dan het RNA-signaal. Andere auteurs hebben soortgelijke experimenten gedaan in rioolwater (de Oliveira et al. 2021; Weidhaas et al. 2021; Hokajärvi et al. 2021) en in primair slib (Roldan-Hernandez et al. 2022). De  $T_{90}$  waarden van alle studies zijn samengevat in figuur 2.3. De resultaten van verschillende studies verschillen aanzienlijk, maar geven wel aan dat RNA lang in rioolwater en slib aantoonbaar kan blijven. Bij temperaturen van 15-25°C ligt de  $T_{90}$  in rioolwater op 8,6-25,6 dagen. Omdat de hydraulische retentietijd in het riool meestal veel korter is, wordt het SARS-CoV-2 signaal niet sterk beïnvloed bij deze afnamesnelheden. Dat is gunstig voor het gebruik van de rioolgegevens voor COVID-19 surveillance.

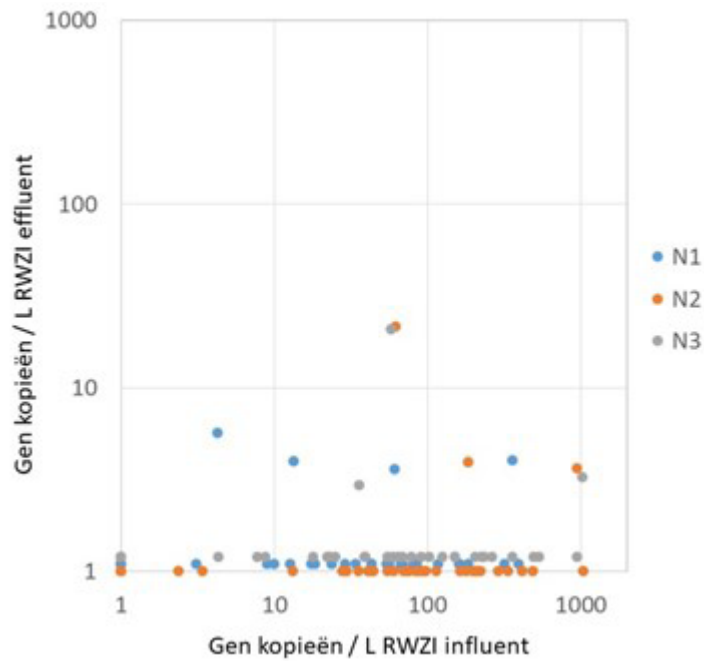
**FIGUUR 2.3 DE SNELHEID WAARMEE HET RNA-SIGNAAL VAN SARS-COV-2 VERDWIJNT UIT INFLUENT EN PRIMAIR SLIB BIJ VERSCHILLENDE TEMPERATUREN**



### 2.3 WAT IS DE VERWIJDERING SARS-COV-2 RNA IN DE RIOOLWATERZUIVERING?

Gegeven de afwezigheid van infectieus SARS-CoV-2 in rioolwater, is verwijdering in de rwzi niet relevant vanuit volksgezondheidsoogpunt. In het begin van de pandemie was dit nog niet duidelijk en zijn er gegevens over de virusverwijdering verzameld. In het voorjaar van 2020 zijn bij 7 rwzi's in Nederland naast influent monsters ook monsters genomen van corresponderend effluent. Dit vond plaats tussen 15 maart en 13 mei 2020, de top van de eerste golf, met relatief hoge concentraties SARS-CoV-2 RNA in influent. Er zijn 34 monsters effluent onderzocht. In 27 daarvan werd geen SARS-CoV-2 RNA aangetroffen, in 7 werd wel een lage concentratie SARS-CoV-2 RNA aangetoond (Figuur 2.4). Met de data van de monsterdagen waarop zowel in in- als effluent SARS-CoV-2 RNA is aangetoond is de verwijdering van de rwzi berekend. Deze lag gemiddeld op 94%, ofwel op 1,2 Log, vergelijkbaar met gegevens over de verwijdering in actief slib installaties in ander onderzoek (Foladori et al. 2022). Dit berekende rendement is wel onzeker door de op dat moment lage concentraties in het influent.

FIGUUR 2.4 CONCENTRATIES SARS-COV-2 RNA IN RWZI EFFLUENT ALS FUNCTIE VAN DE CONCENTRATIE IN INFLUENT VAN VERSCHILLENDE RWZI'S



(Kumar et al. 2021) vonden voor een UASB een verwijdering van 1,3 Log. Deze verwijderingsefficiëntie is vergelijkbaar met de verwijdering van andere virussen in actief slib installaties (Global Water Pathogen Project ([waterpathogens.org](http://waterpathogens.org))). In ontvangend rivierwater is SARS-CoV-2 RNA niet aangetoond (Rimoldi et al. 2020; Haramoto et al. 2020), behalve op momenten of plaatsen waar een sterke verontreiniging met huishoudelijk afvalwater optreedt (Kolarević et al. 2021; Fongaro et al. 2021; Maidana-Kulesza et al. 2022). We benadrukken nogmaals dat het hier niet gaat om infectieuze virussen, maar om virusfragmenten die geen gezondheidsrisico voor mensen die in contact komen met het ontvangende water opleveren.

# 3

## DEEL II. RIOOLWATERSURVEILLANCE

### 3.1 ACHTERGROND RIOOLWATERSURVEILLANCE

Rioolwatersurveillance is tijdens de COVID-19 pandemie zeer snel doorontwikkeld als een van de instrumenten in de publieke gezondheidszorg om zicht te krijgen op de aanwezigheid van SARS-CoV-2 in de populatie (Medema, Heijnen, et al. 2020; Lodder and de Roda Husman 2020). Rioolwatersurveillance is opgepakt in zeer veel landen (COVIDPoops19 Dashboard | covid19wbec.org) en op verschillende schaalniveaus, van nationale surveillance op alle rwzi's zoals met de Nationale Rioolwater Surveillance (NRS) in Nederland (Virus particles in wastewater | Coronavirus Dashboard | Government.nl) of een selectie van rwzi's (Szennyvizekben mért SARS-CoV-2 vírus koncentrációja (gov.hu); Koronaviruksen jätevesiseurannan viikkoraportti (thl.fi); Données ouvertes - Réseau OBEPINE (reseau-obepine.fr); Coronastep | Luxembourg Institute of Science and Technology (list.lu); SARS-CoV-2 in Wastewater (sensors-eawag.ch)), een regionale inzet (Wolfe et al., 2021; Ai et al., 2021; Sarsaigua (icra.cat)), op stadsniveau (Yaniv et al., 2021; Rodríguez Rasero et al., 2022) en soms zelfs op gebouwniveau (Davo et al., 2021; Sweetapple et al., 2021; Betancourt et al., 2021). De trend in de concentratie SARS-CoV-2 RNA in rioolwater blijkt een sterke relatie te hebben met de trend in gerapporteerde nieuwe besmettingen en ziekenhuisopnames. (Medema et al., 2020a; Prado et al., 2021; Ho et al., 2021). In situaties met een lage COVID-19 prevalentie (en/of een beperkte testbereidheid en/of een beperkte testcapaciteit), is rioolwatersurveillance gebruikt als 'early warning system' (Medema et al., 2020b; Betancourt et al., 2021; Ahmed et al., 2021).

Rioolwatersurveillance is ook een efficiënt middel om de opkomst van nieuwe zorgwekkende varianten te monitoren, gebruik makend van DNA sequencing technieken (Rios et al., 2021; Rothman et al., 2021; Jahn et al., 2021) of gerichte PCR methodes (Graber et al., 2021; Heijnen et al., 2021). Een groot voordeel van rioolwatersurveillance is de mogelijkheid om objectieve informatie te krijgen over de circulatie van het virus in een gemeenschap. Immers, rioolwatersurveillance is niet afhankelijk van menselijk gedrag, zoals tot uitdrukking komt in een soms sterk variabele testbereidheid. Rioolwater surveillance kan worden gebruikt om te signaleren of er sprake is van een verandering in testgedrag, waardoor de resultaten van de teststraten meer of juist minder representatief zijn voor de gehele populatie.

Daar staat tegenover dat het rioolwatersurveillance alleen kan worden toegepast in gebieden waar (het grootste deel van) de populatie is aangesloten op riolering. In een groot deel van de wereld met beperkte sanitatie is rioolwatersurveillance niet direct mogelijk, maar zijn wel voorbeelden van het gebruik van andere meetlocaties, zoals drains of riviertjes die 'informal settlements' afwateren, of openbare toiletten op markten of busstations.

Tijdens de pandemie is besluitvorming over maatregelen, zoals (slimme, gedeeltelijke of gehele) lockdowns en reisrestricties, in veel gevallen gebaseerd op informatie over de trends in de viruscirculatie en dan in het bijzonder de trend in de week of 2 weken voorafgaand aan het te nemen besluit. Een voorbeeld daarvan zijn de EU reismaatregelen (<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/situation-updates/weekly-maps-coordinated-restriction-free-movement>), die gebaseerd waren op de testresultaten over de voorafgaande 2 weken. Om

rioolwatersurveillance in te kunnen zetten voor besluitvorming in deze (of een volgende) pandemie, moet deze dus zodanig worden opgezet dat het mogelijk is om een betrouwbaar beeld van de trend over de laatste 2 weken te bieden.

De rioolwatersurveillance voor SARS-CoV-2 monitoring maakt gebruik van de kennis en ervaring die in de afgelopen decennia is opgedaan met ‘wastewater based epidemiology’, ofwel WBE. Deze methode werd al toegepast voor poliovirus (van der Avoort et al., 1995) en meer recent voor monitoring van drugs gebruik (Castiglioni et al., 2014) en antibiotica-resistentie (Hendriksen et al., 2019). Ook in Nederland is deze vorm van WBE regelmatig ingezet (H2Oactueel, 17 juni 2020, Blaak et al., 2021) WBE omvat de volgende ‘standaard’ onderdelen:

- Voorbereiding: selectie en inrichting bemonsteringslocatie, gebiedsafbakening
- Bemonstering: 24 uren volume proportionele bemonstering wordt gezien als de standaard om een betrouwbaar en representatief monster te verkrijgen. Dit is doorgaans haalbaar bij rioolgemalen en rwzi’s, maar meer bovenstrooms in het rioolstelsel is dit vaak niet haalbaar en wordt ook tijdsproportionele bemonstering ingezet met monsternamekasten of passieve samplers.
- Monster handling: verzamelen en vervoeren naar laboratorium
- Labanalyse: analyse monster op relevante parameter, zoals drugs, virussen of bacteriën
- Berekening dagvracht: vermenigvuldiging gemeten concentratie met dagvolume rioolwater
- Normalisatie dagvracht naar referentie aantal personen, doorgaans 1.000 of 100.000 personen
- Terugrekenen aantal gebruikers/besmette personen door te delen door een gemiddelde dosis of uitscheiding

De laatste stap, terugrekenen van het aantal besmette personen, door te delen door de ‘gemiddelde’ uitscheiding is bij SARS-CoV-2 vooralsnog een brug te ver, vanwege beperkte gegevens over uitscheiding, met name aan het begin van de infectie en de enorme variatie tussen personen en in de tijd die naar voren komt uit wel bekende gegevens.

In formulevorm komt de standaard WBE berekening, zoals bijvoorbeeld gebruikt in het coronadashboard van de nationale rioolwatersurveillance <https://coronadashboard.rijks-overheid.nl/>, daarom neer op:

$$L_{24h,100.000} = c_{sample} * V_{24h} \frac{100.000}{\#inw} \quad (1)$$

Waarin:

$L_{24h,cap}$	= virus vracht per 24h en per 100.000 inwoners
$c_{monster}$	= concentratie SARS-CoV-2 RNA in 24 uren monster
$V_{24h}$	= rioolwater volume over dezelfde 24 uur als de monstername
$\#inw$	= aantal inwoners

De rioolwater surveillance levert betrouwbare resultaten indien aan de volgende voorwaarden wordt voldaan:

1. Het rioolwater op de monsternamelocatie is representatief voor de virusuitscheiding door de populatie
2. De populatie varieert niet sterk

3. Het monster is representatief voor het rioolwater op de monsternamelocatie
4. De debietmeting is voldoende betrouwbaar
5. De labanalyse is voldoende betrouwbaar

De mate waarin aan de eerste voorwaarde kan worden voldaan wordt bepaald door de route die de ontlasting volgt en de processen die tijdens die route de virusvracht beïnvloeden. Ten eerste zal de ontlasting in het riool terecht moeten komen. Dit is een voorwaarde die in Nederland meestal opgaat, maar bijvoorbeeld door incontinentie of wanneer de behoefte 'elders' wordt gedaan niet opgaat. Dit kan vooral metingen op een klein schaalniveau, zoals een verzorgingstehuis, beïnvloeden. In plaatsen die veel toeristen ontvangen kan de populatie in vakantieperiodes veel groter zijn dan het aantal geregistreerde inwoners. Op dergelijke locaties moet daar rekening mee worden gehouden. Ten derde wordt de virusvracht tijdens het transport door het riool beïnvloed door allerlei processen in de riolering, waaronder temperatuur afhankelijke afbraak, bezinking en resuspensie, aanhechting aan biofilm en lozingen via riooloverstorten. Ten vierde geldt dat bij lange verblijftijden of transporttijden, bijvoorbeeld door pompstoringen of bij persleidingen met een zeer lange verblijftijd, het rioolwater op een bepaalde monstername dag niet representatief is voor de uitscheiding op die dag.

De derde en vierde voorwaarde worden bepaald door de kwaliteit en zorgvuldigheid van de selectie van de meetlocatie en de uitvoering van de meetopzet. Deze voorwaarden hebben de uitvoerders van WBE, anders dan de eerste voorwaarde, in eigen hand.

De vijfde voorwaarde wordt bepaald door de stand der analyse techniek en de zorgvuldigheid van de uitvoering van de labanalyse. Strenge kwaliteitscontroles en uitvoering in duplo vormen de basis voor het voldoen aan de vierde voorwaarde.

In het onderzoeksproject 'Rioolwatersurveillance Rotterdam-Rijnmond' is in het bijzonder aandacht besteed aan monstername, labanalyse en het ontwikkelen van normalisatieroutines voor het bewaken van de representativiteit van het analyseresultaat en de uitscheiding door de populatie.

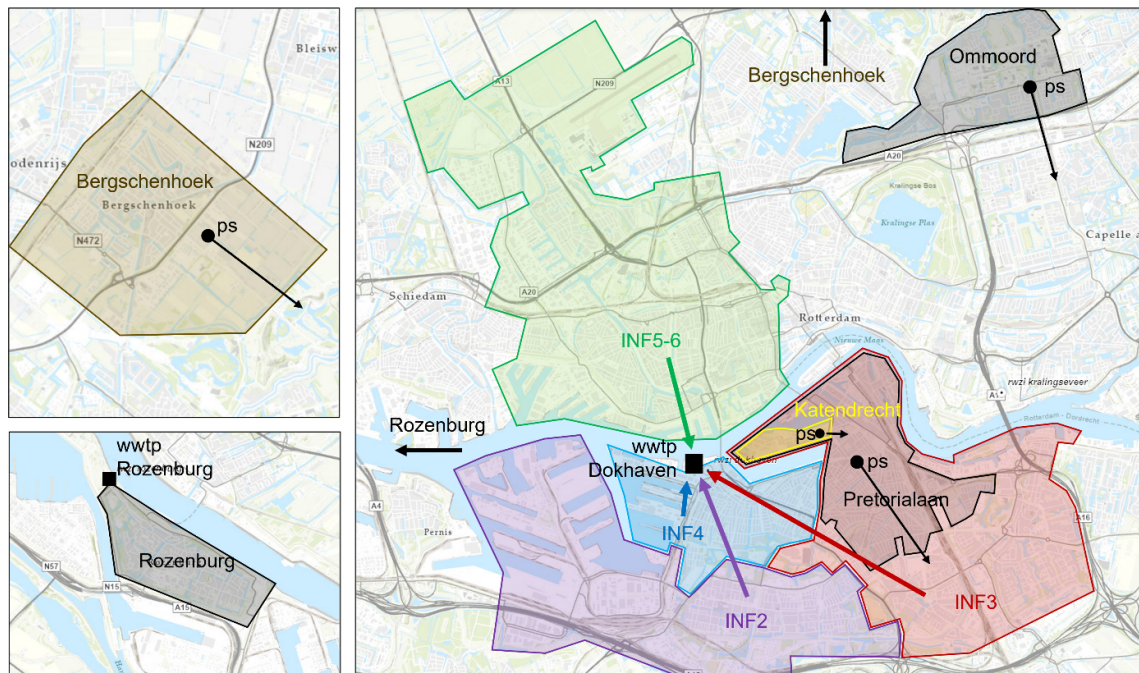
## 3.2 METHODE EN AANPAK ONDERZOEK

### 3.2.1 LOCATIEKEUZE EN BESCHRIJVING CASES

De locatiekeuze in het project is gebaseerd op de mogelijkheden om te onderzoeken in hoeverre de informatie uit de ondergrond, dus de riolering, te matchen is met informatie uit de bovengrond, ofwel huisartsbezoeken, testresultaten, ziekenhuisopnames en overledenen. In mei/juni 2020 was nog lang geen sprake van massaal testen in teststraten, waardoor bij de selectie van de onderzoeksgebieden de nadruk lag op het vinden van een match tussen het voorzieningsgebied van een huisartsenpraktijk en het onderliggende rioolstelsel. Beiden hebben andere begrenzingen dan de bekende CBS indeling in wijken en buurten, waardoor de locatiekeuze uitzoekwerk vergt. Dankzij het systeemoverzicht riolering van gemeente Rotterdam beschikten we over duidelijke gebiedsbegrenzingen per rioolstelsel en door deze te leggen over het voorzieningsgebied van huisartsenpraktijken zijn drie gebieden, Rozenburg, Ommoord en Katendrecht, geselecteerd waar deze match te maken is. Om inzicht te krijgen in het effect van schaalgrootte op de onderzoeksresultaten zijn naast deze 'kleine' deelgebieden ook deelgebieden geselecteerd met een oplopende gebiedsgrootte, zie de kaart in figuur 3.1. De oplopende gebiedsgrootte komt het sterkst tot uitdrukking in de 'cascade', waarbij het kleinste deelgebied Katendrecht pompt in het benedenstroomse deelgebied Pretoriaaan, dat

weer een deel vormt van de aanvoer op rwzi Dokhaven uit de aanvoerstreng met benaming INF3, dat tenslotte weer een deel vormt van het totale influent van rwzi Dokhaven.

FIGUUR 3.1 OVERZICHT MEETLOCATIES EN ONDERZOEKSGBIEDEN



In totaal zijn 9 deelgebieden geselecteerd en meegenomen in het meetproject. Dit betreffen de vier aanvoergebieden van rwzi Dokhaven, genaamd INF2, INF3, INF4 en INF5-6, met een populatie van respectievelijk 27.044, 121.118, 36.011 en 138.280 personen op basis van CBS kentallen uit 2020. Binnen INF3 ligt het bemalingsgebied Pretoriaaan met 71.325 inwoners en daarbinnen het bemalingsgebied Katendrecht met 4.884 inwoners.

Buiten het verzorgingsgebied van rwzi Dokhaven is ook gemeten bij het influent van rwzi Rozenburg met 12.374 inwoners, en bij de gemalen van Ommoord met 28.434 inwoners en Bergschenhoek met 18.750 inwoners. Bergschenhoek is per begin 2021 toegevoegd in verband met grootschalig onderzoek naar de opkomst van de Alpha-variant op deze locatie.

### 3.2.2 MEETOPZET EN BEMONSTERING

Alle meetlocaties, dus zowel de rioolgemalen als de aanvoerstrengen op de rwzi's, waren al voorzien van debietmeters, waarvan bij aanvang van het project is gecontroleerd of deze plausibele meetwaarden opleveren (en dat bleek het geval). Op elke meetlocatie is verder gebruik gemaakt van automatische monsternamekasten met volumeproportionele bemonstering. De monsternamekasten zijn zodanig ingeregeld dat zij conform NEN6600-1, 2019 tenminste 100 monsters van 50 ml nemen over een periode van 24 uur op de dag met minimale DWA aanvoer. Dat betekent concreet dat bij het kleinste gebied, gemaal Katendrecht, een monster wordt genomen per 12 m<sup>3</sup> verpompt rioolwater en bij INF3 per 170 m<sup>3</sup> influent.

Op alle meetlocaties is hetzelfde monsternameschema aangehouden, gebaseerd op drie 24uurs monsters per week, genomen over de periodes zondag 8:00 tot maandag 8:00, dinsdag 8:00 tot woensdag 8:00 en donderdag 8:00 tot vrijdag 8:00. De monsternamekasten zijn ingesteld op een temperatuur tussen 1°C en 5°C. De monsters werden opgehaald tussen

08:00 en 16:00 op de monsternamedagen. De monsternemers zorgden door handmatig te roeren voor een goede menging in het monsternamevat voordat zij daaruit een monster van 250 ml nemen om in een steriele fles naar het laboratorium te brengen.

Bij de monstername is ook de standaard kwaliteitscontrole op de monstername uitgevoerd, waarbij het monstervolume is vergeleken met het theoretische monstervolume op basis van de debietmeting. Tussen 6 en 10% (varieert per locatie) van de monsternames is compleet mislukt om uiteenlopende redenen, zoals stroomstoring, gemaalonderhoud, verstopping van de monsternamekast, feestdag of een bevroren aanzuigslang. Daarnaast was bij tussen de 4% en 19% van de monsters sprake van een afwijking groter dan 7,5%. Per geval is in detail onderzocht of het monster desondanks toch als representatief kan worden beschouwd, en werden als niet-representatief beoordeeld indien meerdere opeenvolgende deelmonsters ontbraken, maar wel representatief indien de missende deelmonsters verspreid over de 24 uur voorkwamen. Tabel 3.1 geeft een overzicht van de aantallen geanalyseerde monsters over de periode september 2020-augustus 2021. Het totaal aantal succesvol geanalyseerde monsters ligt op 83,8%. Dit laat zien dat bij de monstername rekening moet worden gehouden met aanzienlijke verliezen en dat de monsternamefrequentie wat hoger gekozen moet worden dan het minimum dat nodig is om de beoogde trendanalyse te kunnen uitvoeren. Duidelijk zichtbaar in de data is dat monstername bij het influent van de rwzi een hoger percentage goede monsters oplevert, dan de (tijdelijke) opstellingen bij de rioolgemalen, zoals bij Ommoord en Katendrecht.

**TABEL 3.1 AANTAL MONSTERNAMEDAGEN, AANTAL GEFAALDE MONSTERNAMES (GEEN MONSTER), AANTAL MONSTERS MET AFWIJKING GROTER DAN 7,5% EN AANTAL GEANALYSEERDE MONSTERS VOOR PERIODE SEPTEMBER 2020 - AUGUST 2021**

deelgebied	Aantal bemonsteringen	Geen monster	Afwijking > 7.5%	Aantal geanalyseerde monsters
rwzi Dokhaven - INF2	154	13 (8,4%)	8 (5,4%)	137 (89,0%)
rwzi Dokhaven - INF3	154	12 (7,8%)	6 (3,9%)	137 (89,0%)
rwzi Dokhaven - INF4	154	13 (8,4%)	13 (8,4%)	131 (85,1%)
rwzi Dokhaven - INF5-6	154	11 (7,1%)	6 (3,9%)	134 (87,0%)
RG Pretoriaaan	149	11 (7,4%)	20 (13,4%)	132 (88,6%)
RG Katendrecht	155	14 (9,0%)	21 (13,5%)	123 (79,4%)
RG Ommoord	155	11 (7,1%)	29 (18,7%)	103 (66,5%)
rwzi Rozenburg	155	10 (6,5%)	13 (8,4%)	135 (87,1%)
RG Bergschenhoek	101	10 (9,9%)	9 (8,9%)	84 (83,2%)
<b>Totaal</b>	<b>1.331</b>	<b>105 (7,9%)</b>	<b>125 (9,4%)</b>	<b>1.116 (83,8%)</b>

### 3.2.3 LABORATORIUMANALYSE

#### *Vorbewerking en extractie*

De wekelijks aangeleverde set monsters is opgewerkt volgens de procedure uit Medema et al., 2020. Deze procedure bestaat uit centrifugeren om grotere deeltjes te verwijderen en vervolgens de virusdeeltjes te concentreren uit 50 ml supernatant van de centrifuge via Centricon® Plus-70 centrifugal ultrafilters met een cut-off van 30 kDa (Millipore, Amsterdam, Netherlands). Mouse Hepatitis Virus (MHV)-A59 (Department Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands) is gespiket op elk concentraat voor kwaliteitscontrole. Nucleïnezuren zijn geëxtraheerd uit het concentraat met behulp van de Biomerieux Nuclisens kit (Biomerieux, Amersfoort, Netherlands) in combinatie met de semi-automatische KingFisher mL (Thermo Scientific, Bleiswijk, Netherlands). De geëxtraheerde nucleïnezuren bevonden zich daarna in een volume van 100 µl.

*RT-qPCR voor kwantificeren SARS-CoV-2 RNA in rioolwatermonsters*

Het N2 en E gen fragment van SARS-CoV-2 zijn gebruikt als qRT-PCR targets. N2 is gebruikt voor de kwantificering, E. Sarbeco voor bevestiging. In de eerste periode werd het monster als negatief beschouwd als E Sarbeco niet werd aangetroffen. Later werd duidelijk dat de N assay wat gevoeliger was dan de E assay en is deze voorwaarde losgelaten. De gebruikte reagentia en reactie omstandigheden zijn conform Medema et al., 2020a en Heijnen et al., 2021. Alle RT-qPCR runs zijn uitgevoerd als technisch duplicaat op 5 µl geëxtraheerd nucleïnezuur. De reactie is als positief beschouwd bij maximaal 40 cycli. De gespikete MHV-A59 RNA is gemeten met een MHV-A59 specifiek RT-qPCR target met behulp van de primers en het reactie profiel zoals beschreven in Raaben et al., (2007).

*PCR voor kwantificeren crAssphage in rioolwatermonsters*

Een PCR specifiek voor crAssphage CPQ\_064 is gebruikt om de crAssphage te kwantificeren. De assays zijn eveneens in tweevoud uitgevoerd op 5 µl 1:10 verdund geëxtraheerd nucleïnezuur (Heijnen et al., 2021).

*PCR voor analyse crAssphage in monsters van ontlasting*

Ontlasting van 221 positief geteste patiënten uit de regio Rotterdam Rijnmond is verzameld in 3 ml virus transportmedium. De monsters zijn gedurende 5 minuten afgedraaid op 17,000g. De nucleïnezuren zijn geïsoleerd uit 200 µl supernatant met een Roche isolatie kit exclusief de DNase I stap.

### 3.2.4 KWALITEITSBORGING EN NORMALISATIE

Zoals aangegeven in paragraaf 3.1. is in het onderzoek veel aandacht besteed aan kwaliteitsborging. Voor de PCR analyses is daarbij gebruik gemaakt van de MHV positieve controle in elk monster en van blanco monsters bij elke PCR run. Alle analyses zijn in duplo uitgevoerd. Doordat crAssphage een vrij constante vracht en concentratie in het riool bleek te hebben, is de crAssphage assay ook als kwaliteitsborging gebruikt. Indien de concentratie van crAssphage duidelijk lager was dan de gemiddelde concentratie, werd dat monster niet meeegenomen in het resultaat.

Een belangrijke stap hierin is het gebruik van verschillende normalisatiemethodes naast elkaar. Een verschil tussen gebruikte methodes kan duiden op niet of minder representatief monster door gemaalstoringen, riooloverstoringen of onjuiste aanname van aantal personen dat bij kan dragen aan de virusuitscheiding.

De onderzochte en wekelijks toegepaste normalisatiemethodes zijn:

- Normalisatie op basis van gemeten debiet: met behulp van debietmetingen is het mogelijk om het aandeel 'huishoudelijk' afvalwater in het monster te bepalen en op die manier rekening te houden met de in de tijd variabele verdunning met industrieel afvalwater, rioolvreemd water en afstromende neerslag.
- Normalisatie op basis van geleidbaarheid: geleidbaarheid is een eenvoudig te meten parameter die een goede maat geeft voor de mate van verdunning van een monster ten gevolge van afstromende neerslag (Launay et al., 2016)
- Normalisatie op basis van crAssphage: crAssphage is een virus dat leeft in darmbacteriën en dat daarmee dezelfde route door het riool volgt als de SARS-CoV-2 deeltjes. Dit maakt crAssphage, mits sprake is van een stabiele uitscheiding in de populatie, theoretisch tot een zeer geschikte normalisator voor het aantal 'uitscheiders' dat op de dag van monstername in het onderzoeksgebied fecaliën heeft uitgescheiden en afgevoerd naar het riool.



*Normalisatie op basis van debiet*

De normalisatie op basis van debiet is uitgevoerd in twee stappen:

1. Op basis van aantal inwoners in het onderzoeksgebied volgens CBS en een vaste afvalwaterproductie per inwoner van 120 liter per persoon per dag is de te verwachten dagelijkse hoeveelheid *huishoudelijk* afvalwater bepaald.
2. Met behulp van formule (2) en het gemeten dagdebiet  $V_{24h}$  is daaruit het aandeel huishoudelijk afvalwater op de monsternamedag bepaald:

$$\% \text{ huishoudelijk afvalwater} = \frac{\# \text{ inwoners} * \text{gemiddelde dwa}}{V_{24h}} * 100\% \quad (2)$$

De normalisatie volgens formule (2) levert daarbij exact dezelfde trend op als de normalisatie volgens formule (1). Het verschil zit in het al dan niet normaliseren naar 100.000 personen en het meenemen van een gemiddelde dwa. Het voordeel van het gebruik van formule (2) is de eenvoud van de vergelijking met formule (3) en (4), waarmee het aandeel huishoudelijk afvalwater wordt berekend met behulp van geleidbaarheid en crAssphage.

*Normalisatie op basis van geleidbaarheid*

Geleidbaarheid is een goede parameter om de mate van verdunning door neerslag te bepalen. Echter, ook tijdens droogweer bestaat het rioolwater niet alleen uit huishoudelijk afvalwater, maar ook uit rioolvreemd water en industrieel afvalwater. Bij de normalisatie met behulp van geleidbaarheid wordt daarom eerst de gemiddelde verdunning tijdens droog weer bepaald. De normalisatie op basis van geleidbaarheid verloopt via de volgende drie stappen:

1. Op basis van het aantal inwoners in het onderzoeksgebied volgens CBS, de vaste afvalwaterproductie per inwoner van 120 liter per persoon per dag is wederom de te verwachten dagelijkse hoeveelheid huishoudelijk afvalwater bepaald. Door dit te delen door de referentie droog weer aanvoer  $V_{DWA \text{ ref}}$  dat is vastgesteld in eerder STOWA onderzoek (Mulder et al., 2020) op de 40 percentiel waarde van de gedurende een jaar gemeten dagafvoeren, is de mate van verdunning bij DWA bepaald. Voor onderzoeksgebieden met een sterk in de tijd variërende hoeveelheid rioolvreemd water, bijvoorbeeld door een seizoensgebonden infiltratie van grondwater via lekke riolen, kan het wenselijk zijn om een seizoensgebonden referentie droog weer aanvoer af te leiden.
2. Op basis van de gemeten geleidbaarheid (EC) op droge dagen, gedefinieerd als alle meetwaarden op dagen waarvan het gemeten dagdebiet ligt tussen de 10 en 50 percentielwaarde uit een jaarreeks, is de droog weer referentie geleidbaarheid ( $EC_{DWA \text{ ref}}$ ) bepaald.
3. Met behulp van formule (3) en de gemeten geleidbaarheid  $EC_{\text{monster}}$  is daaruit het aandeel huishoudelijk afvalwater op de monsternamedag bepaald:

$$\% \text{ huishoudelijk afvalwater} = \frac{\# \text{ inwoners} * \text{gemiddelde dwa}}{V_{DWA \text{ ref}}} * \frac{EC_{\text{monster}}}{EC_{DWA \text{ ref}}} 100\% \quad (3)$$

*Normalisatie op basis van crAssphage*

De normalisatie op basis van crAssphage is op twee manieren mogelijk. De meest eenvoudige is door de gemeten SARS-CoV-2 concentratie te delen door de gemeten concentratie crAssphage. Om de drie normalisatie methodes onderling te kunnen vergelijken moeten deze allemaal dezelfde opzet hebben. Dat is gerealiseerd door de normalisatie op basis van crAssphage via exact dezelfde stappen te laten verlopen als de normalisatie via geleidbaarheid en in plaats van geleidbaarheid de gemeten waarde voor crAssphage te gebruiken. In formulevorm komt dit voor crAssphage normalisatie neer op:

$$\% \text{ huishoudelijk afvalwater} = \frac{\# \text{ inwoners} * \text{gemiddelde dwa}}{V_{DWA \text{ ref}}} * \frac{crAss_{\text{monster}}}{crAss_{DWA \text{ ref}}} 100\% \quad (4)$$

*Berekenen concentratie SARS-CoV-2 in huishoudelijk afvalwater*

De concentratie SARS-CoV-2 in huishoudelijk afvalwater is bepaald door de in het laboratorium gemeten concentratie te delen door het percentage huishoudelijk afvalwater en op die manier te corrigeren voor de variabele verdunning.

**3.2.5 TRENDANALYSE**

De trendanalyse is uitgevoerd om de samenhang te onderzoeken tussen de genormaliseerde rioolmetingen en testresultaten. De trendanalyse is elke twee weken uitgevoerd vanaf half september 2020. De gebruikte methode en modelopzet is daarbij steeds aangepast naar wat de beschikbare data toelieten of waar de analyse op dat moment om vroeg. Uitgangspunt bij de modellering was steeds om de modellering zo eenvoudig mogelijk te houden.

De testresultaten van GGD teststraten zijn elke twee weken geanonimiseerd aangeleverd door ErasmusMC. Daarbij is zowel het aantal testen als het aantal positieve en negatieve testen aangeleverd per onderzoeksgebied. Voor de toewijzing aan de onderzoeksgebieden zijn de postcodes (4 cijfers, 2 letters) gebruikt.

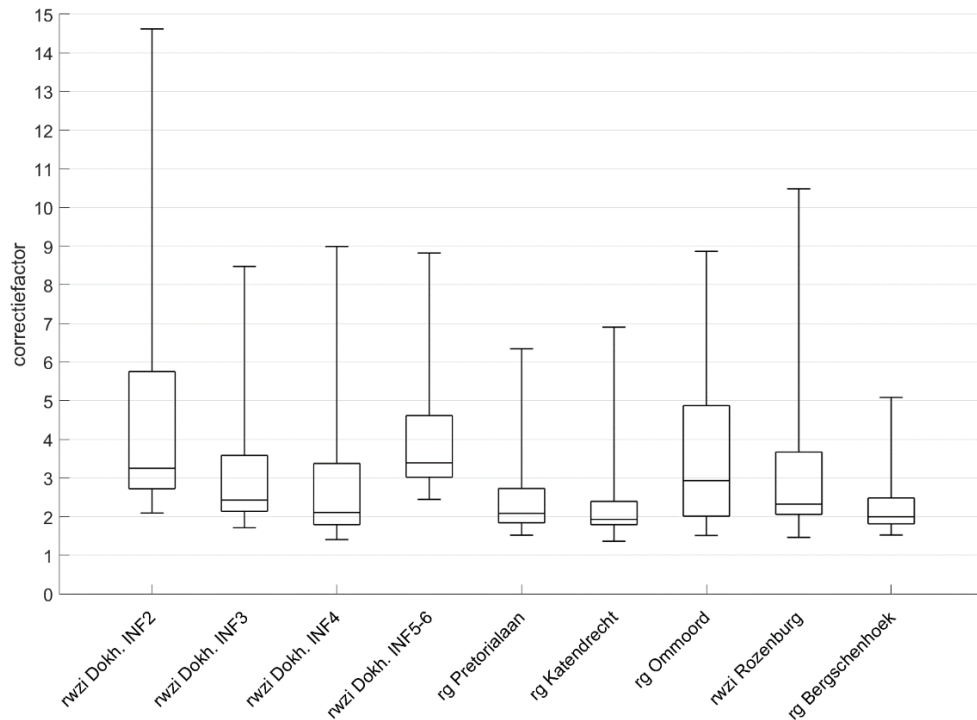
**3.3 RESULTATEN****3.3.1 NORMALISATIE OP BASIS VAN DEBIET**

De onderzoeksgebieden in Rotterdam-Rijnmond zijn allemaal (ten minste voor een groot deel) gemengd gerioleerd. Dat betekent dat verwacht mag worden dat de mate van verdunning van het huishoudelijk afvalwater een grote spreiding vertoont ten gevolge van neerslag. De theoretisch maximale verdunning op basis van gemeten debieten wordt bereikt indien een gemaal 24 uur lang op maximaal debiet draait over de monsternamedag, die loopt van 08:00 tot 08:00. De maximaal haalbare verdunning is in dit onderzoek op geen enkele locatie bereikt. De maximale gemeten verdunning is opgetreden bij gebied INF2. Bij dit gebied bedraagt de pompcapaciteit 2.500 m<sup>3</sup>/h, waarmee over 24 uur 60.000 m<sup>3</sup> kan worden verpompt. Bij een productie van huishoudelijk afvalwater van 3.245 m<sup>3</sup> per dag bedraagt de theoretisch maximale verdunning een factor 18,5, ofwel: een afvalwatermonster zou op dat moment voor slechts 5,4% bestaan uit huishoudelijk afvalwater, er van uitgaande dat het rioolstelsel op dat moment niet overstort. De maximale piekfactor voor INF2 in het onderzoek bedraagt 14,6 zie figuur 3.2. Bij deze factor bedraagt het aandeel huishoudelijk afvalwater in het monster nog slechts 6,9%.

Voor bijvoorbeeld INF3 geldt dat het de maximale piekfactor ligt op 9,9 bij een productie van huishoudelijk afvalwater van 14.534 m<sup>3</sup> en een maximaal in 24 uur te verpompen volume van 144.000 m<sup>3</sup>. De maximaal bereikte piekfactor ligt bij INF3 op 8,5.

Niet alleen de maximale correctiefactoren verschillen per gebied, ook de spreiding verschilt per gebied, zie figuur 3.2. De spreiding in correctiefactoren is het grootst in INF2, een deelgebied met een relatief groot aandeel industrieel afvalwater en bij Ommoord, een deelgebied met een over het jaar variabele hoeveelheid rioolvreemd water. De mediane waarde ligt tussen de 2 en 3,5, hetgeen bevestigt dat in de onderzochte rioolstelsels een significante hoeveelheid rioolvreemd water aanwezig is. De verschillen in de correctiefactoren tussen de gebieden laat zien dat normalisatie van in het lab gemeten SARS-CoV-2 concentraties noodzakelijk is om gebieden onderling te kunnen vergelijken.

FIGUUR 3.2 BOXPLOT CORRECTIEFACTOREN BIJ TOEPASSING VAN NORMALISATIE OP BASIS VAN DEBIET



### 3.3.2 VERGELIJKING METHODES VOOR NORMALISATIE

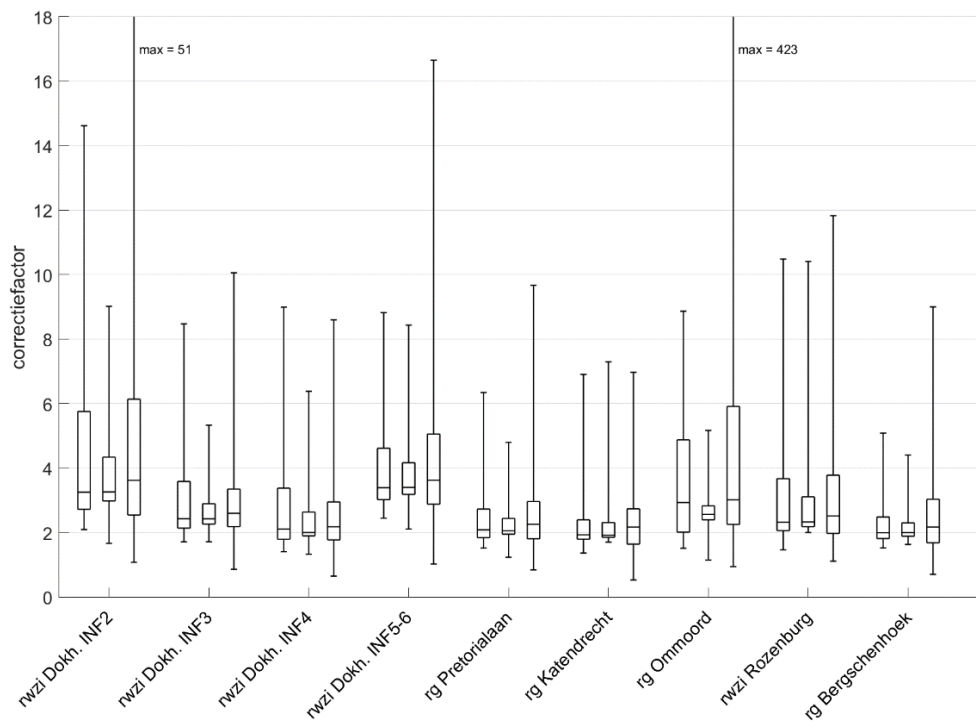
De methodes voor normalisatie zijn op drie manieren vergeleken:

- Op basis van de verdeling van de correctiefactoren conform figuur 3.2
- Op basis van de correlatie tussen correctiefactoren
- Op basis van de trend in gecorrigeerde concentraties SARS-CoV-2

#### *Verdeling correctiefactoren*

De verdeling van de correctiefactoren voor de drie normalisatiemethodes is opgenomen in figuur 3.3. De mediane waarden voor de drie methodes liggen dicht bij elkaar. De correctiefactoren op basis van geleidbaarheid variëren ongeveer even veel en voor sommige gebieden wat minder dan de correctiefactoren op basis van debieten, terwijl de correctiefactoren op basis van crAssphage een beduidend grotere spreiding vertonen. Dit hangt samen met de grotere variabiliteit in de meetwaarden voor crAssphage dan voor geleidbaarheid. In de resultaten van figuur 3.3 zijn alle beschikbare crAssphage metingen meegenomen, dus inclusief mogelijke outliers, hetgeen de extreme waarden in de figuur verklaart.

FIGUUR 3.3 **BOXPLOT CORRECTIEFACTOREN BIJ TOEPASSING VAN NORMALISATIE OP BASIS VAN DEBIET (LINKS), GELEIDBAARHEID (MIDDEN) EN CRASSPHAGE (RECHTS)**



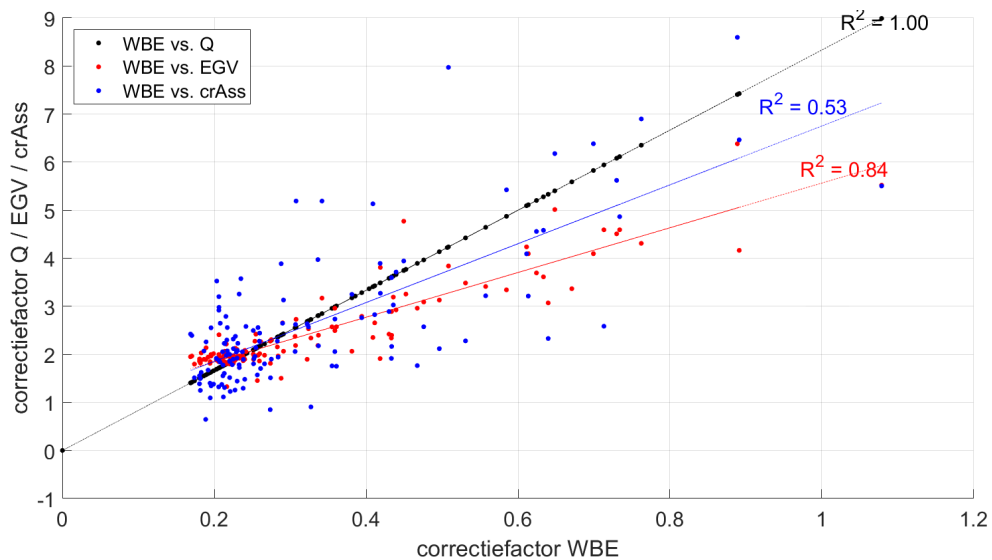
#### Correlatie tussen correctiefactoren

De mate waarin de correctiefactoren overeen komen is ook inzichtelijk gemaakt door de correlatie te bepalen tussen de correctiefactoren uit vergelijkingen 2, 3 en 4 met de algemene WBE methode uit vergelijking 1. Deze correlaties zijn voor het deelgebied Dokhaven INF4 uiteengezet in figuur 3.4.

De correlatie tussen de gebruikte debietnormalisatie en de standaard WBE heeft een  $R^2$  waarde van 1,0, aangezien deze alleen een vaste factor van elkaar verschillen door het gebruik van een vaste hoeveelheid huishoudelijk afvalwater per persoon (vergelijking 2) en normalisatie naar 100.000 personen (vergelijking 1). De correlatie tussen standaard WBE en normalisatie op basis van geleidbaarheid volgens vergelijking 3 heeft een  $R^2$  van 0,84 en is daarmee ook sterk. De correlatie tussen standaard WBE en crAssphage gebaseerde normalisatie is minder sterk met een  $R^2$  van 0,53. Dit is voor een belangrijk deel te wijten aan de grote variatie in achtergrondconcentratie bij droogweeraanvoer (rond de 0,2 op de x-as)

FIGUUR 3.4

## CORRELATIE TUSSEN CORRECTIEFACTOREN EN STANDAARD WBE BIJ TOEPASSING VAN NORMALISATIE OP BASIS VAN DEBIET, GELEIDBAARHEID EN CRASSPHAGE



Tabel 3.2 geeft een overzicht van de correlaties voor alle meetlocaties. De correlaties met geleidbaarheid liggen voor de meeste locaties op een hoog niveau in de range tussen 0,7 en 0,9, met uitzondering van het kleinste onderzoeksgebied Katendrecht en in het gebied Ommoord. Bij Ommoord was regelmatig sprake van zeer hoge geleidbaarheid van meer dan 2-3 keer zo hoog gecombineerd met een hoge aanvoer bij DWA. Dit lijkt te duiden op een forse instroom van brak rioolvreemd water. Tijdens deze periodes mislukten ook vaak de analyses op crAssphage (en op SARS-CoV-2) door een lage recovery. Kennelijk bevatte het rioolvreemd water op dat moment stoffen die de labanalyse verstoorden. Dit is ook terug te zien in de zeer lage  $R^2$  bij Ommoord voor de correlatie tussen standaard WBE en normalisatie met behulp van crAssphage. De correlatie tussen standaard WBE en crAssphage was voor alle locaties met een range tussen 0,3 en 0,6 fors lager dan die met geleidbaarheid. Normaliseren met behulp van geleidbaarheid leidt daarmee tot een 'strakkere' normalisatie dan met behulp van crAssphage.

TABEL 3.2

CORRELATIES ( $R^2$ ) TUSSEN WBE EN NORMALISATIE OP BASIS VAN DEBIET, GELEIDBAARHEID EN CRASSPHAGE

Locatie	WBE vs. Q	WBE vs. EC	WBE vs. crAss
rwzi Dokhaven - INF2	1.00	0.73	0.31
rwzi Dokhaven - INF3	1.00	0.74	0.58
rwzi Dokhaven - INF4	1.00	0.84	0.53
rwzi Dokhaven - INF5-6	1.00	0.84	0.43
RG Pretoriaaan	1.00	0.86	0.44
RG Katendrecht	1.00	0.37	0.19
RG Ommoord*	1.00	0.00	0.03
rwzi Rozenburg	1.00	0.89	0.51
RG Bergschenhoek	1.00	0.79	0.29

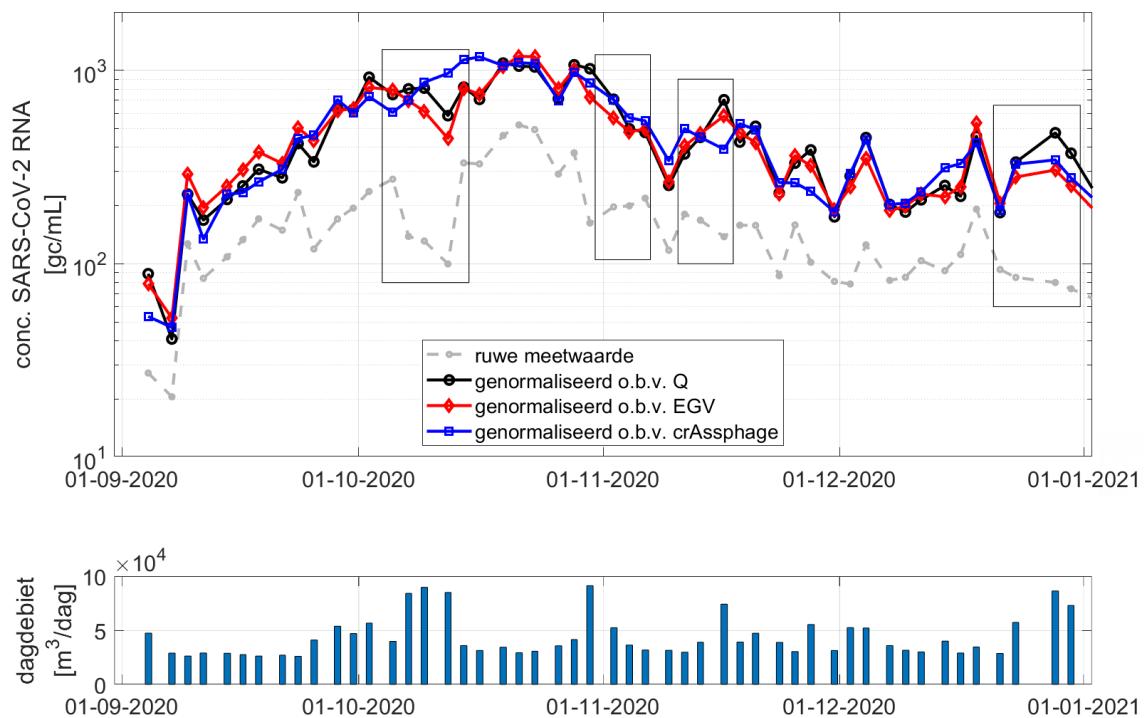
*Trends in genormaliseerde concentraties SARS-CoV-2*

Een van de doelen van de normalisatie is het kunnen uitvoeren van betrouwbare trendanalyses op het SARS-CoV-2 meetsignaal, waarbij de periode waarover de trend moet 'kloppen' twee weken bedraagt, passend op de wijze van besluitvorming over reisrestricties in 2021 in de EU. Figuur 3.5 toont de ruwe meetdata en de op basis van debiet, geleidbaarheid en crAssphage genormaliseerde concentraties voor de periode september-december 2020. De op basis

van debiet en op basis van geleidbaarheid genormaliseerde waarden vertonen vrijwel altijd een grote mate van overeenkomst. Dit geldt in het algemeen ook voor de op basis van crAssphage genormaliseerde waarden. De uitzondering is de tweede week van oktober, waarin op drie opeenvolgende datapunten de normalisatie op basis van crAssphage flink afweek van de normalisatie op basis van debiet en geleidbaarheid. Voor trends over een periode van twee weken komen alle drie de methodes goed overeen. Deze bevinding geldt voor alle locaties met uitzondering van Ommoord, zie bijlage I.

Figuur 3.5 maakt ook duidelijk dat normalisatie noodzakelijk is bij trendanalyse. In deze vier maanden zijn vier periodes aangeduid waarin de genormaliseerde waarden een andere trend vertonen dan de niet genormaliseerde labmeting. In de periode in begin oktober regende het veel, waardoor de niet genormaliseerde concentratie in het rioolwater daalde, terwijl de genormaliseerde concentraties ongeveer gelijk bleven. Begin november was juist sprake van een stijging van de ruwe meetwaarden, terwijl de genormaliseerde waarden sterk daalden, gevolgd door een periode half november waarin dit weer precies tegengesteld was. In de periode eind december daalden de niet genormaliseerde labwaarden licht, terwijl de genormaliseerde waarden sterk stegen.

**FIGUUR 3.5 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIES IN AFVALWATER: RUWE MEETWAARDES EN GENORMALISEERDE MEETWAARDES IN BOVENSTE GRAFIEK EN DAGDEBIETEN IN ONDERSTE GRAFIEK**

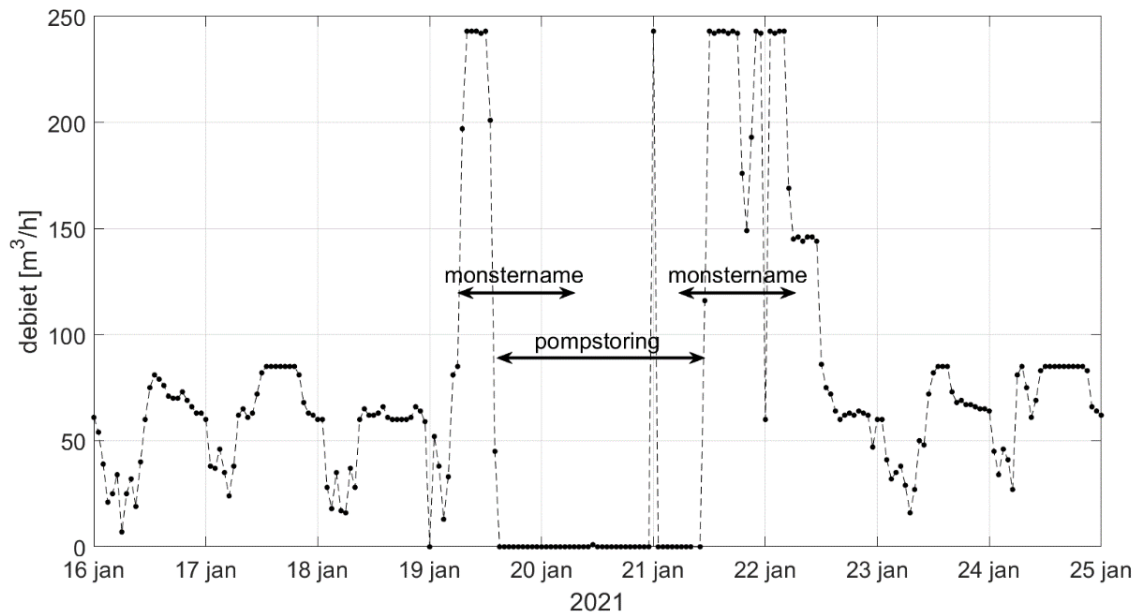


### 3.3.3 BORGING DATA KWALITEIT DOOR NORMALISATIE

De drie gebruikte parameters voor normalisatie, debiet, geleidbaarheid en crAssphage, geven over het algemeen een vergelijkbare correctie. Een afwijkende correctiefactor kan duiden op een situatie waarin het monster niet langer representatief is voor de uitscheiding in het onderzoeksgebied. Dit is bijvoorbeeld het geval bij de gemaalstoring bij rioolgemaal Katendrecht op 19-20 januari 2021.

Op 19 januari viel er een bui, waardoor de RWA pomp van het gemaal insloeg. Om 15:00 viel het gemaal in storing, hetgeen pas echt weer was opgelost op 21 januari. Het monster van 19 januari is daardoor alleen representatief voor het rioolwater tijdens de eerste 7 uur op 19 januari: dus van 8:00 tot en met 15:00. De correctiefactor op basis van debiet bedroeg voor deze monsternamen 1,8, terwijl de correctiefactor op basis van geleidbaarheid 6,9 bedroeg en op basis van crAssphage 7,6. Met andere woorden: zowel de geleidbaarheid als de CrAssphage laten zien dat sprake was van een sterke verdunning tijdens de bui, alleen het gemeten debiet komt daar niet mee overeen. Het grote verschil in de correctiefactor laat duidelijk zien dat er iets 'mis' was met de representativiteit van het monster. Bij het monster van 21 januari gold het omgekeerde: op basis van de debietmeting volgt een correctiefactor van 6,9, immers, de pomp heeft urenlang gedraaid op RWA capaciteit om het stelsel weer leeg te krijgen. Op basis van geleidbaarheid volgt een correctiefactor van 2,6 en uit de crAssphage een van 4,1. Dit laat zien dat het rioolwater dat in het monster van 21 januari zat slechts deel was verdund door regenwater, maar vooral bestond uit rioolwater van 20 januari dat nog in het stelsel stond. Op beide monsterdagen was het monster door de pompstoring derhalve niet representatief voor de uitscheiding in het onderzoeksgebied.

FIGUUR 3.6 GEMAALSTORING RIOOLGEMAAL KATENDRECHT



Tabel 3.3 geeft een overzicht van de momenten waarop uit de vergelijking van de normalisatie van de drie methodes naar voren is gekomen dat sprake was van een verminderde representativiteit. In 7 gevallen is het monster afgekeurd vanwege te beperkte representativiteit door gemaalstoringen of onderhoud.

TABEL 3.3 OVERZICHT AFWIJKENDE NORMALISATIES OP BASIS VAN DEBIET, GELEIDBAARHEID EN CRASSPHAGE

gebied	periode	oorzaak	effect op WBE normalisatie
Alle gebieden	22 Jan - 19 Feb 2021	Koude periode met sneeuw, hoge geleidbaarheid door strooien met pieken op dagen met neerslag en smelten van de sneeuw op 27 Jan, 10 Feb en 12 Feb	Debietnormalisatie betrouwbaar, normalisatie op geleidbaarheid niet mogelijk
Alle gebieden	1 Jul - 23 Jul 2021	Droge periode met uitzakkend grondwater en daardoor afname rioolvreemd water, zichtbaar in lagere dagvolumes bij gelijk-blijvende geleidbaarheid	Debietnormalisatie betrouwbaar
rwzi Dokhaven INF2	3 Jun 2021	Hoog dagvolume bij normale geleidbaarheid veroorzaakt gemalen die een deel van de voorliggende dag stil hadden gestaan door onderhoud.	Monster niet representatief
rwzi Dokhaven INF4	22 Sep 2020	Erg hoge geleidbaarheid (1.850 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en 20% hoger dagvolume zonder neerslag. Mogelijk extra industrieel afvalwater	Debietnormalisatie betrouwbaar, normalisatie op geleidbaarheid niet mogelijk
rwzi Dokhaven INF4	4 Dec 2020	Hoog dagvolume (2*DWA) door neerslag, echter beperkte verdunning op basis van geleidbaarheid en crAssphage	Monster meegenomen
RG Pretorialaan	11 Nov 2020	Lager dagvolume dan normaal door pompstoring bij inprikkend rioolgemeal Katendrecht. Geleidbaarheid en CrAssphage normale waarde voor DWA	Monster niet representatief
RG Pretorialaan	15 Mar 2021	20% hoger dagvolume dan normaal bij gelijke geleidbaarheid en crAssphage	Monster niet representatief
RG Katendrecht	11 Nov 2020	Laag dagvolume door pompstoring bij normale geleidbaarheid en crAssphage	Monster niet representatief
RG Katendrecht	20 Nov 2020	Hoge geleidbaarheid (1.350 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), 50% extra dagvolume door neerslag en verdunning crAssphage passend op extra volume door neerslag	Debietnormalisatie betrouwbaar, normalisatie op geleidbaarheid niet mogelijk
RG Katendrecht	2 Dec 2020	Pompstoring met als gevolg dagvolume niet overeenkomt met gemeten lagere geleidbaarheid en crAssphage	Monster niet representatief
RG Katendrecht	20 Jan 2021	Pompstoring met als gevolg dagvolume niet overeenkomt met gemeten lagere geleidbaarheid en CrAssphage, zie voorbeeld figuur 3.6	Monster niet representatief
RG Katendrecht	22 Jan 2021	Pompstoring met als gevolg dagvolume niet overeenkomt met gemeten geleidbaarheid en CrAssphage, zie voorbeeld figuur 3.6	Monster niet representatief
RG Katendrecht	26 May 2021	Debiet en CrAssphage duiden op verdunning door neerslag, terwijl geleidbaarheid niet lager is	Debietnormalisatie betrouwbaar, normalisatie op geleidbaarheid niet mogelijk
RG Katendrecht	9 Aug 2021	Debiet en CrAssphage duiden op verdunning door neerslag, terwijl geleidbaarheid niet lager is	Debietnormalisatie betrouwbaar, normalisatie op geleidbaarheid niet mogelijk

### 3.3.4 CONTROLE OP AANTALLEN UITSCHIEDERS MET BEHULP VAN CRASSPHAGE

De standaard WBE normaliseert de labmeting naar het aantal inwoners in een gebied. Bij een onjuist geregistreerd aantal inwoners zal het aantal inwoners niet overeenkomen met het aantal uitscheiders, hetgeen resulteert in een onjuiste normalisatie. Daarnaast is het mogelijk dat het aantal aanwezige inwoners in de vakantieperiodes lager uitvalt of juist (veel) hoger in toeristische gebieden zoals de Waddeneilanden of de Zeeuwse kust, doordat daar ten opzichte van het aantal inwoners zeer veel toeristen kunnen zijn. Dit leidt tot duidelijk herkenbare pieken op het coronadasboard, die voornamelijk te wijten zijn aan de onjuiste normalisatie naar aantallen uitscheiders.

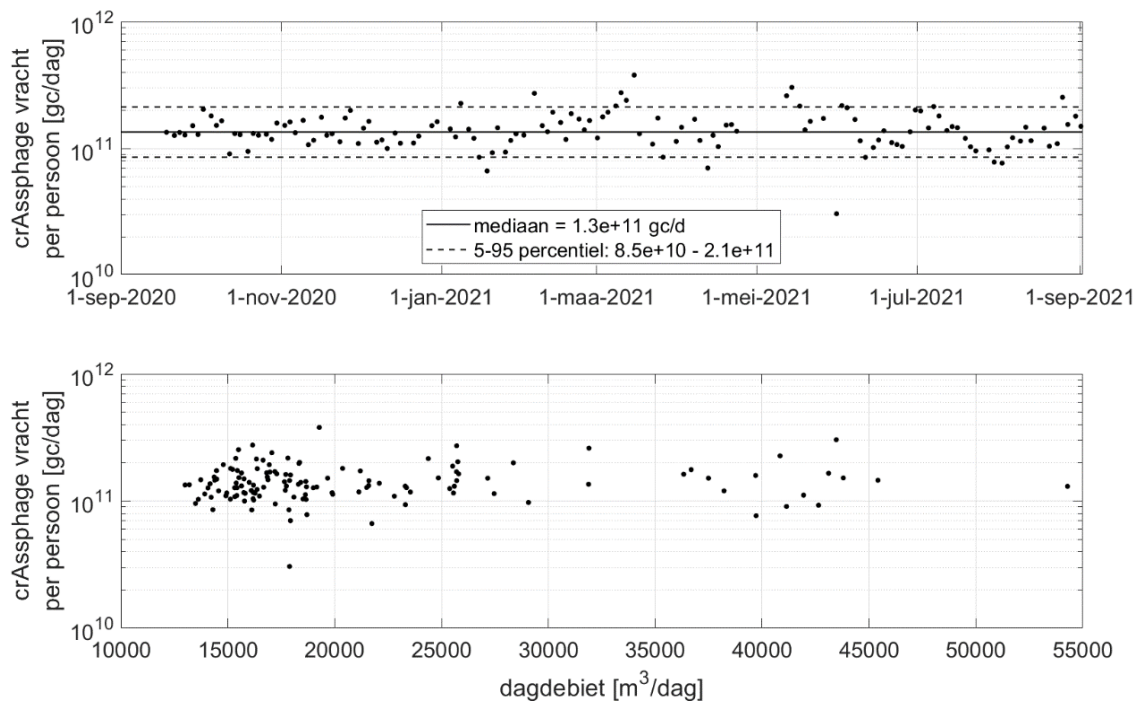
Ook voor de onderzoeksgebieden in Rotterdam is bekend dat in de zomer minder mensen aanwezig zijn. In de zomervakantie ligt de influentdagvracht van stikstof en fosfaat, twee stoffen die voornamelijk via urine en fecaliën worden geloosd, bij rwzi Dokhaven 10-15% lager dan verwacht mag worden op basis van het aantal inwoners.



In dit onderzoek is verkend in hoeverre het mogelijk is om met behulp van crAssphage te controleren of het aantal uitscheiders overeenkomt met het aantal inwoners op basis van CBS data. Dit is onderzocht door de dagvracht crAssphage te berekenen en deze uit te drukken in dagvracht crAssphage per persoon. Deze dagvrachten zijn onderling vergeleken en ook vergeleken met de dagvracht die volgt uit de analyse van ontlasting van 221 COVID19 patiënten.

Figuur 3.7 geeft een voorbeeld van de berekende crAssphage dagvrachten per persoon. Deze zijn zowel uitgezet tegen de tijd (bovenste grafiek) als tegen het afvalwatervolume. De mediane crAssphage vracht per persoon ligt binnen onderzoeksgebied Pretoriaaan op  $1,3 \cdot 10^{11}$  genkopieën/dag binnen een bandbreedte (5 en 95 percentiel) van  $8,6 \cdot 10^{10}$  en  $2,1 \cdot 10^{11}$ . Deze bandbreedte is relatief klein voor een microbiële parameter. De orde van grootte komt bovendien redelijk goed overeen met de waarden die uit de steekproef van 221 patiënten naar voren komt, zie figuur 3.8. De variatie in deze steekproef is wel heel groot met een range van meer dan  $10 \log^{10}$  eenheden. Een klein percentage (4,5%) heeft geen detecteerbare hoeveelheid crAssphage in de ontlasting, terwijl de overige patiënten kennelijk zijn in te delen in twee groepen, waarbij een groep een beperkte hoeveelheid crAssphage uitscheidt met gemiddeld ongeveer  $10^{4.5}$  genkopieën per ml fecaliën en een andere groep beduidend meer met gemiddeld ongeveer  $10^{9.3}$  genkopieën per ml fecaliën. Met een gemiddelde hoeveelheid fecaliën van 128 g nat gewicht per persoon per dag (Rose et al., 2015) komt de gemiddelde vracht uit op  $8,7 \cdot 10^{10}$  genkopieën per persoon per dag. Deze vracht komt wat orde van grootte betreft overeen met de mediane vrachten voor alle onderzoeksgebieden, zie tabel 3.4, die varieert van  $1,2 \cdot 10^{11}$  tot  $1,6 \cdot 10^{11}$ .

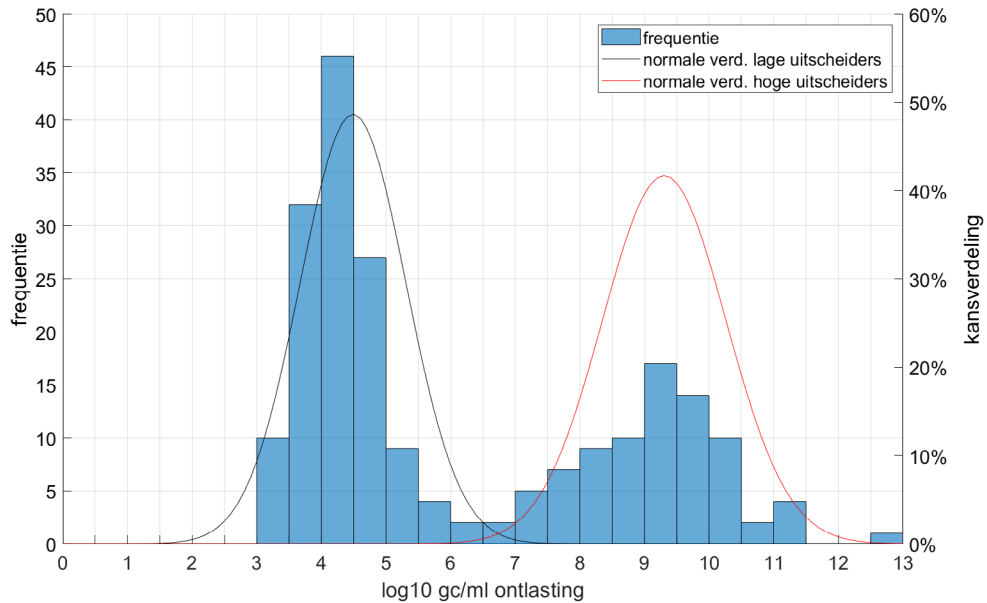
**FIGUUR 3.7** CRASSPHAGE VRACHT PER PERSOON PER DAG UITGEZET TEGEN DE TIJD (BOVEN) EN TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER) VOOR LOCATIE PRETORIALAAN



De onderste grafiek uit figuur 3.7 en de grafieken in bijlage II laten zien dat de crAssphage vracht per persoon per dag geen relatie heeft met het volume rioolwater. Dit illustreert dat nalevering uit het rioolstelsel van crAssphage, in tegenstelling tot bij de reguliere afvalwa-

terparameters zoals stikstof, fosfaat, CZV (Schilperoort et al., 2012) of verontreinigingen die gebonden zijn aan sediment (Gasperi et al., 2014), geen rol speelt. Dit bevestigt de bevindingen van Balleste et al., 2019).

**FIGUUR 3.8** CRASSPHAGE IN FECALIËN VAN COVID-19 PATIËNTEN UIT REGIO ROTTERDAM-RIJNMOND. DE CONCENTRATIE CRASSPHAGE VARIËERT VAN PERSOON TOT PERSOON, WAARBIJ DUIDELIJK TWEE PIEKEN IN DE VERDELING ZIJN WAAR TE NEMEN. EEN DEELPOPULATIE MET EEN LAGE UITSCHIEDING EN EEN DEELPOPULATIE MET EEN HOGE UITSCHIEDING



**TABEL 3.4** OVERZICHT DAGVRACHTEN CRASSPHAGE PER PERSOON PER LOCATIE

Locatie	5 percentiel [gc/dag]	Mediaan [gc/dag]	95 percentiel [gc/dag]
rwzi Dokhaven - INF2	$8.6 * 10^{10}$	$1.6 * 10^{11}$	$3.0 * 10^{11}$
rwzi Dokhaven - INF3	$8.6 * 10^{10}$	$1.4 * 10^{11}$	$2.8 * 10^{11}$
rwzi Dokhaven - INF4	$7.2 * 10^{10}$	$1.2 * 10^{11}$	$3.0 * 10^{11}$
rwzi Dokhaven - INF5-6	$8.6 * 10^{10}$	$1.3 * 10^{11}$	$3.1 * 10^{11}$
RG Pretoriaaan	$8.6 * 10^{10}$	$1.3 * 10^{11}$	$2.1 * 10^{11}$
RG Katendrecht (na correctie aantal inwoners)	$1.0 * 10^{11}$	$1.6 * 10^{11}$	$2.8 * 10^{11}$
RG Ommoord*	$4.4 * 10^9$	$1.2 * 10^{11}$	$2.5 * 10^{11}$
rwzi Rozenburg	$7.6 * 10^{10}$	$1.3 * 10^{11}$	$2.3 * 10^{11}$
RG Bergschenhoek	$7.1 * 10^{11}$	$1.5 * 10^{11}$	$2.0 * 10^{11}$

Op vrijwel alle locaties wijken de monsters van 10, 12 en 15 maart 2021 steeds verder naar boven af. Het lijkt erop dat die batch een afwijkend meetresultaat heeft opgeleverd. Om dit te ondervangen is in deze rapportage verder gewerkt met de mediaan in plaats van het gemiddelde, aangezien het gemiddelde vrij gevoelig is voor grote afwijkingen naar boven. Verder valt op alle locaties op dat de metingen in de zomerperiode tussen half juli en half augustus, consistent lager liggen dan in de rest van het jaar. De mediaan over deze periode ligt voor RG Pretoriaaan 15% lager dan over de gehele periode. Voor het gehele Dokhaven gebied is dit 14% lager. Dit komt wat orde van grootte betreft overeen met de geconstateerde afname van de stikstof en fosfaatvrucht in de zomermaand bij rwzi Dokhaven.

Ten slotte kwam bij de data analyse naar voren dat het aantal inwoners in Katendrecht onjuist was. Bij de voorbereiding van de metingen, die in september 2020 begonnen, is gebruik gemaakt van de CBS data die op dat moment beschikbaar was. Dat betrof de aantallen

inwoners in 2019 en dit aantal bedroeg 4.884. In Katendrecht is sprake van flinke stedelijke ontwikkeling, waardoor het aantal inwoners in 2020 al met 15% was opgelopen tot 5.600 en in 2021 is doorgestegen naar 5.700. Met het inwoneraantal van 4.884 lag de mediaan voor de crAssphage op  $1,9 \cdot 10^{11}$  per persoon per dag. Dit aantal was sterk afwijkend van de overige waardes uit tabel 3.4, hetgeen aanleiding gaf om de gebruikte basisgegevens te controleren. Het voorgaande geeft aan dat de meting van CrAssphage, ondanks de relatief grote variatie per monster, een goede mogelijkheid biedt om het aantal uitscheiders in het onderzoeksgebied te controleren en mee te nemen in de normalisatie.

### 3.4 TRENDANALYSE

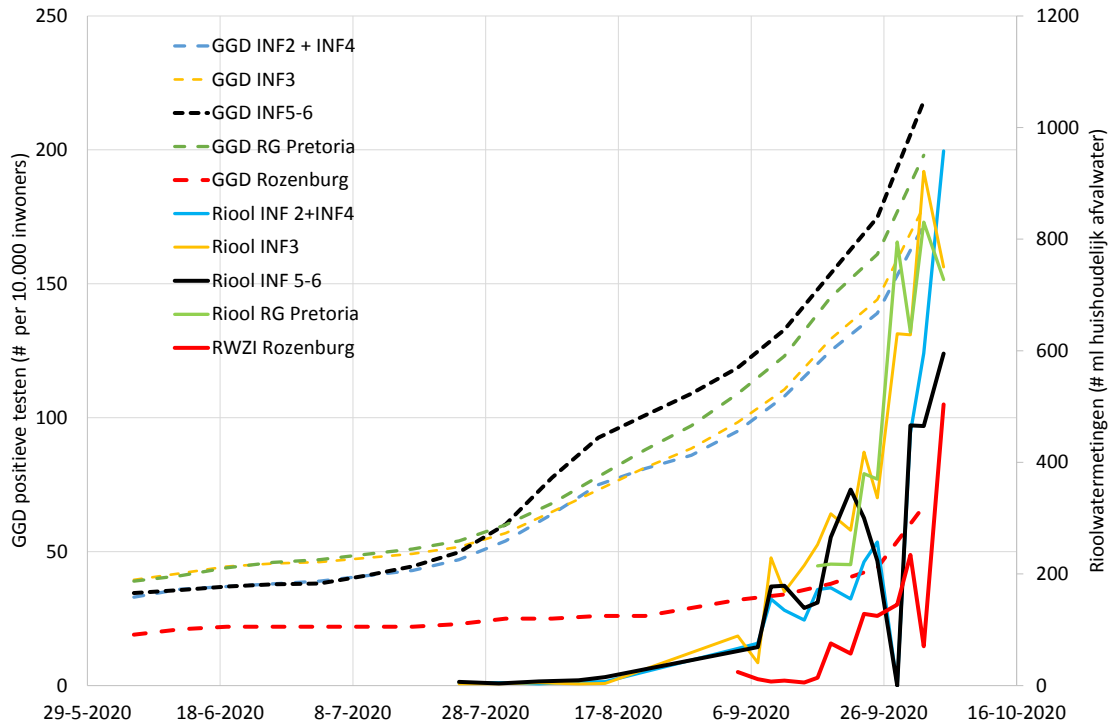
De trendanalyse is elke twee weken uitgevoerd. De gebruikte methodes reflecteren de beschikbare data en de openstaande vragen op dat moment in het onderzoek. De beschrijving van de resultaten is uitgevoerd voor een aantal karakteristieke momenten tijdens het onderzoeksproject. Hier is voor gekozen om in dit rapport niet alleen de eindresultaten te laten zien, maar ook de route er naar toe.

#### 3.4.1 TRENDANALYSE BEGIN 2<sup>E</sup> COVID-19 GOLF: SEPTEMBER EN OKTOBER 2020

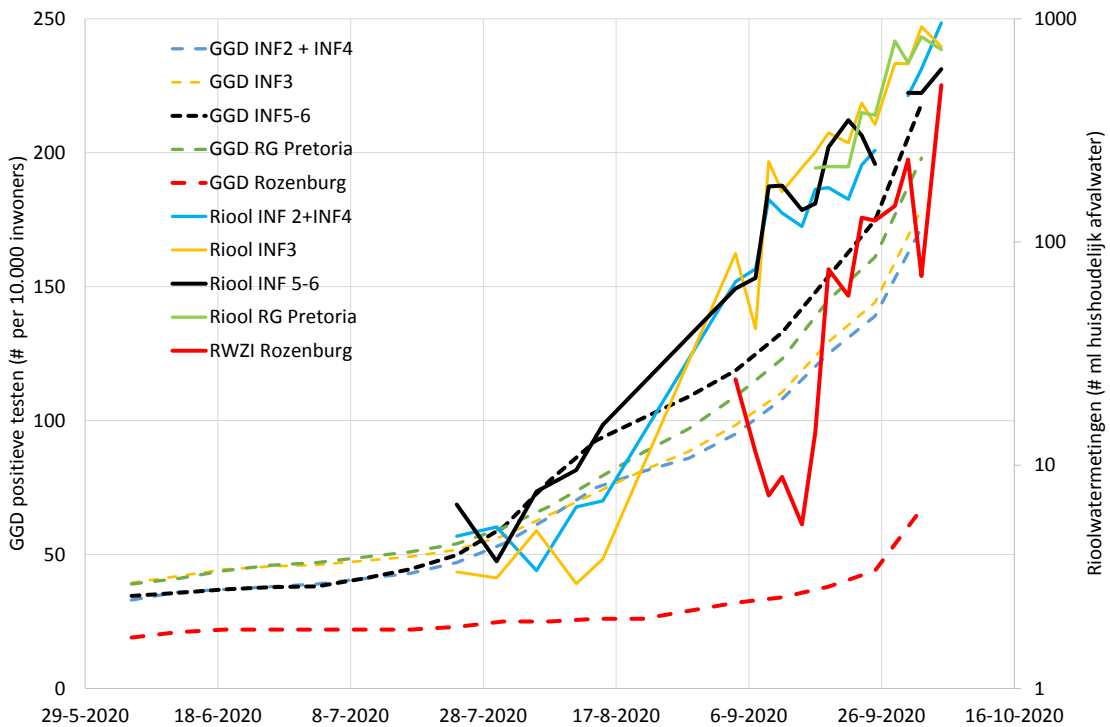
In september en oktober 2020 steeg het aantal besmettingen zeer hard en de overheid probeert hierop in te grijpen met steeds strengere lockdown maatregelen, zoals beperking van aantal bezoekers tot 3 per 29 september en de sluiting van de horeca per 14 oktober. De testcapaciteit was nog beperkt, waardoor in principe alleen mensen met symptomen getest mochten worden. Zie voor meer informatie de tijdlijn uit bijlage III. Het percentage positieve testen liep in die periode op van ongeveer 6% begin september tot rond de 30% eind oktober. Als vuistregel geldt dat bij een percentage ruim boven de 10% de testcapaciteit (of testbereidheid) onvoldoende is om de ontwikkeling van de aantallen besmettingen goed te volgen. De vraag in het onderzoeksproject op dat moment was of de rioolmetingen voorliepen op de aantallen positieve testen en deze dus gebruikt zouden kunnen worden om te voorspellen, ofwel forecasten, of dat de rioolmetingen gelijk liepen met de aantallen positieve testen, waardoor je zou kunnen 'nowcasten' of dat de rioolmetingen zelfs achter zouden lopen en daarmee gebruikt zouden kunnen worden voor backcasting. In de internationale wetenschappelijke wereld bestond er op dat moment nog geen consensus over, diverse onderzoeksgroepen kwamen tot de gehele range van forecasting tot backcasting.

Figuur 3.9 en 3.10 tonen de destijds beschikbare data. De extractie van aantallen positieve testen per bemalingsgebied op basis van postcodes was nog niet rond, waardoor nog is gewerkt met aantallen positieve testen op weekbasis zoals deze vanaf de zomer 2020 op een (niet meer operationeel) dashboard werden gepubliceerd. De figuren tonen dezelfde data, alleen zijn in figuur 3.10 de rioolmetingen op een logschaal geplot. Op basis van figuur 3.9 lijkt het alsof de rioolmetingen 'achter' lopen, terwijl het op basis van figuur 3.10 lijkt alsof de rioolmetingen 'voor' lopen op de positieve testen. De manier van schalen is bij het vergelijken van 2 stijgende lijnen bepalend voor de bevinding. Gevolg was dat op dat moment op basis van de data nog geen uitspraak gedaan kon worden over de relatie tussen testen en rioolwater, behalve dat beiden een sterke stijging vertoonden.

FIGUUR 3.9 AANTAL POSITIEVE TESTEN VERSUS CONCENTRATIE SARS-COV-2 RNA IN HUISHOUDELIJK AFVALWATER



FIGUUR 3.10 AANTAL POSITIEVE TESTEN VERSUS CONCENTRATIE SARS-COV-2 RNA IN HUISHOUDELIJK AFVALWATER



### 3.4.2 TRENDANALYSE 2<sup>E</sup> COVID19 GOLF: SEPTEMBER TOT DECEMBER 2020

In de loop van november en december 2020 werden de maatregelen steeds strenger, met op 4 november een verzwaring van de gedeeltelijke lockdown en op 15 december een volledige lockdown. Zie voor meer informatie de tijdlijn uit bijlage III. Ook op het gebied van testen waren er grote ontwikkelingen met opbouw van testcapaciteit en per 1 december het open stellen van testen voor mensen zonder klachten, met als direct merkbaar effect dat het percentage positieve testen daalde naar ongeveer 10%.

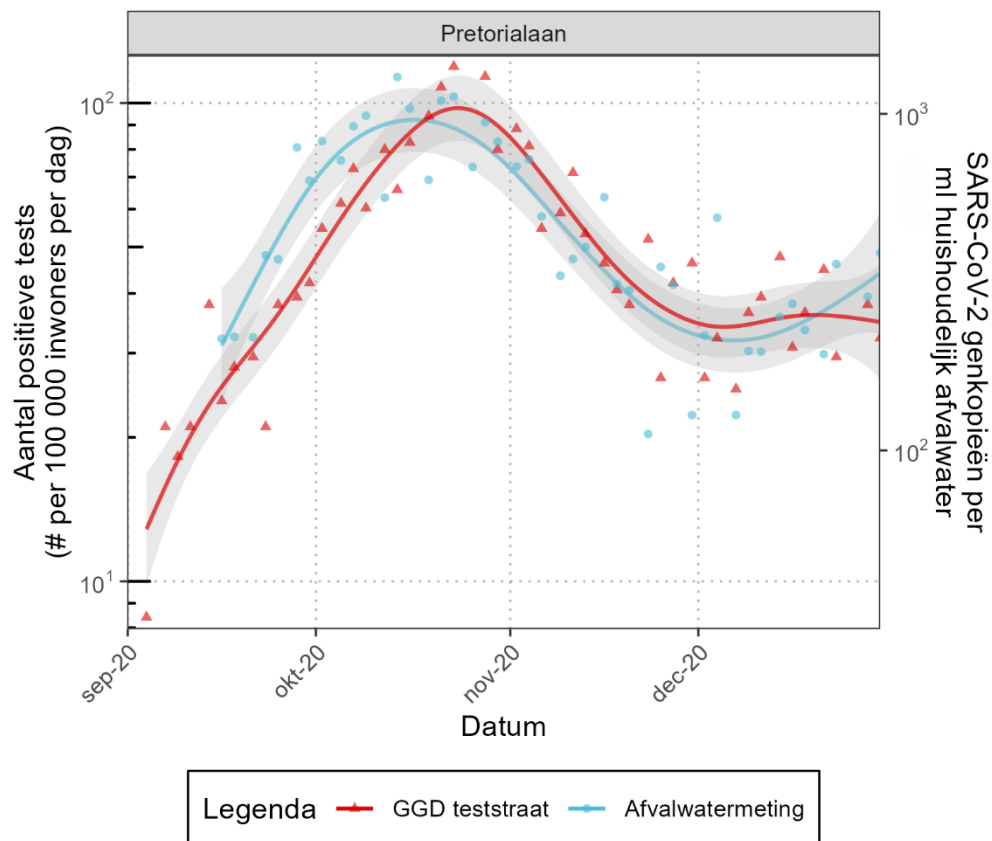
In deze periode is zonder succes geprobeerd om een rekenmodel (regressiemodel) op te stellen waarmee het aantal positieve testen kan worden berekend op basis van de rioolmetingen. De reden hiervoor bleek achteraf te zijn dat de lagtime, ofwel de vertragingstijd tussen de twee tijdseries, niet constant was. Figuur 3.11 toont de eind december beschikbare data voor het gebied van RG Pretoriaaan. Zowel de positieve testen als de riooldata tonen aanvankelijk een stijging, gevolgd door een daling. De piek ligt echter op een ander moment in de tijd en ook laat figuur 3.11 zien dat in de stijgende lijn sprake was van een grotere lagtime en in de dalende lijn. Dit is in eerste instantie aangetoond met standaard data analyse technieken, bestaande uit:

- Voorbewerking om outliers te verwijderen
- Logtransformatie om de variantie te stabiliseren
- Prewhitening (witte ruis toevoegen) om autocorrelatie te verwijderen
- Berekenen lag times met cross correlatie

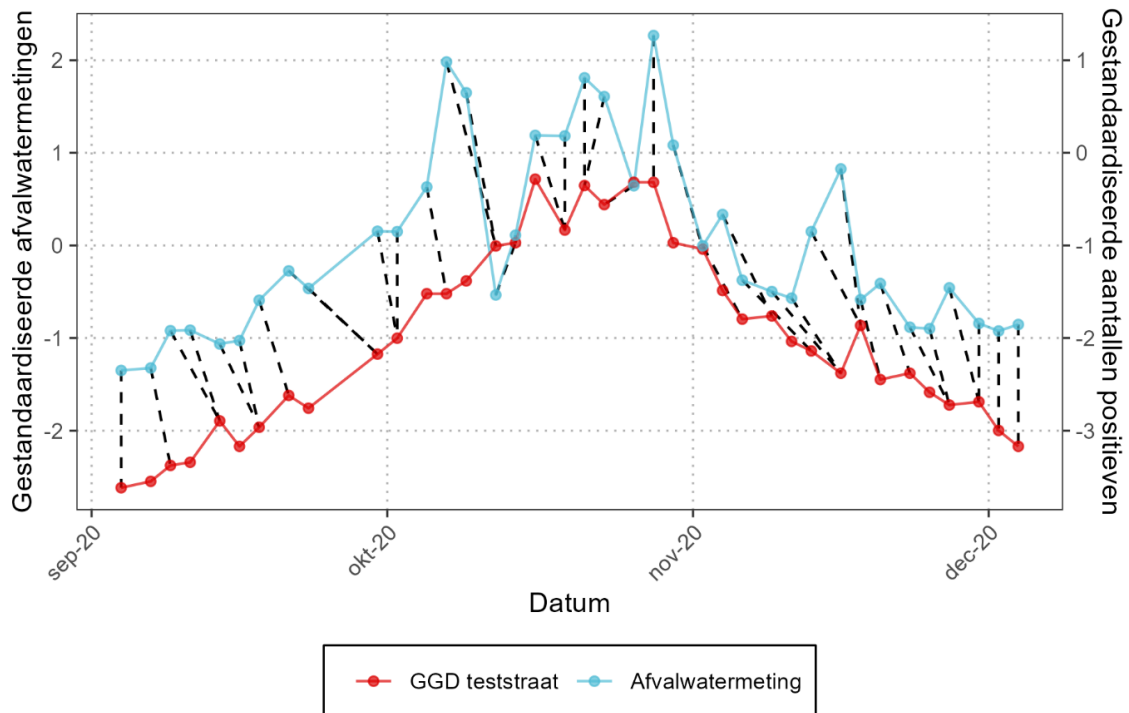
Uit de berekeningen volgde tot aan de piek uit figuur 3.11 een dominante lagtime van 6 dagen en na de piek uit figuur 3.11 een dominante lagtime van 2 dagen.

Daarnaast is de techniek 'dynamic time warping' gebruikt om te onderzoeken hoe de twee tijdreeksen zich tot elkaar verhouden. Deze techniek is door Durrenmatt et al., (2013) gebruikt om meetreeksen in debietmetingen met elkaar te vergelijken. Figuur 3.12 toont een voorbeeld van een resultaat van de dynamic time warping. De helling van de verbindingsstreepjes tussen de riooldata en de testdata geeft aan welk datapunt in de ene reeks het best past bij een datapunt in de andere reeks. Duidelijk zichtbaar is dat deze helling varieert in de tijd, met als consequentie dat een regressiemodel niet tot goede resultaten kan komen.

FIGUUR 3.11 AANTAL POSITIEVE TESTEN VERSUS CONCENTRATIE SARS-COV-2 RNA IN HUISHOUDELIJK AFVALWATER

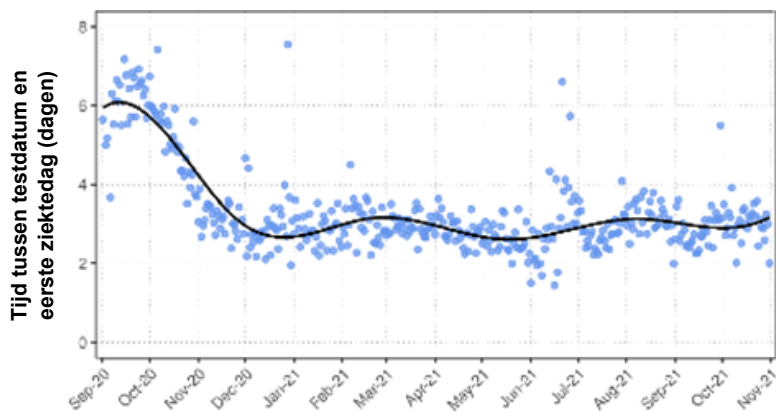


FIGUUR 3.12 VOORBEELD RESULTATEN DYNAMIC TIME WARPING VOOR INF5-6



Begin januari 2021 kwam daarnaast data beschikbaar van het RIVM over de tijd tussen testdatum en eerste ziekte dag. Door het opschalen van de testcapaciteit en de verbeterde organisatie was deze tijd afgenomen van ongeveer 6 dagen begin september naar ongeveer 2 dagen eind december 2020, zie figuur 3.13. De eerste ziekte dag bleek een van de gegevens te zijn die werden vastgelegd bij het afnemen van testen.

FIGUUR 3.13 GEMIDDELD TIJDSVERSCHIL TUSSEN TESTDATUM EN EERSTE ZIEKTEDAG



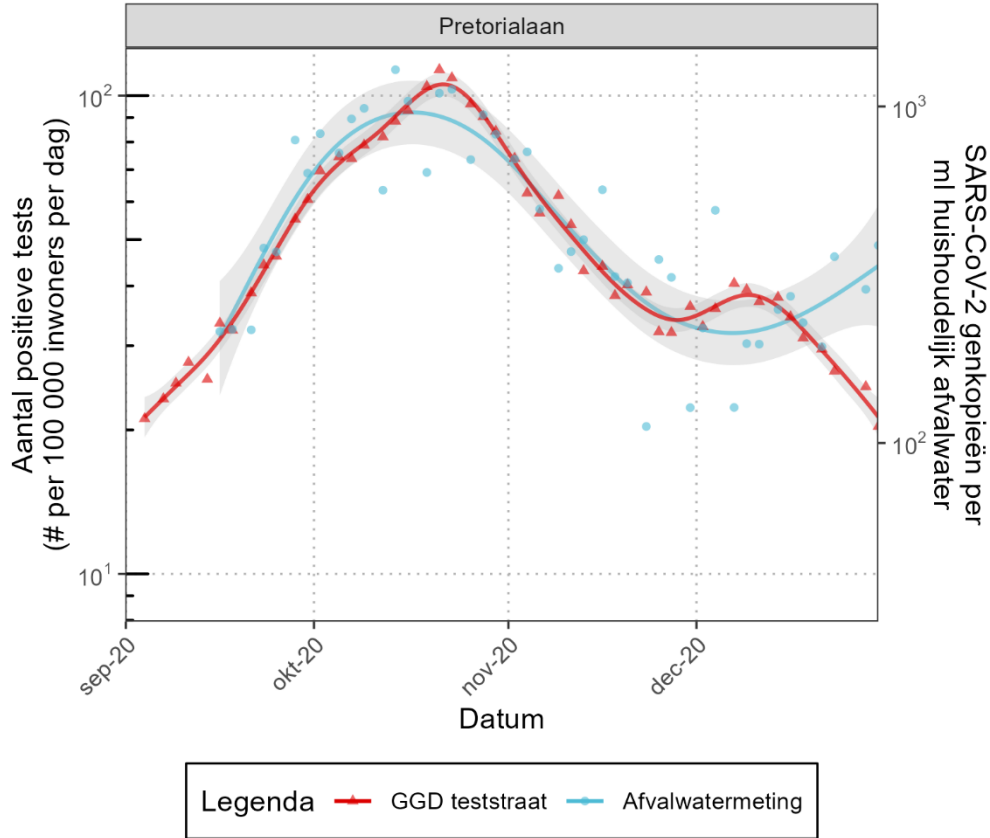
Figuur 3.14 toont dezelfde data als figuur 3.11, maar dan voor de situatie waarin de positieve  $tp$  testen uitgezet zijn tegen de geregistreerde eerste ziekte dag (EZD). De curves voor rioolmetingen en positieve testen liggen behoorlijk strak op elkaar, zodat het mogelijk werd om per locatie een lineair regressiemodel op te stellen van de vorm:

$$\text{aantal positieve testen} = a * \text{concentratie rioolwater} + b \quad (5)$$

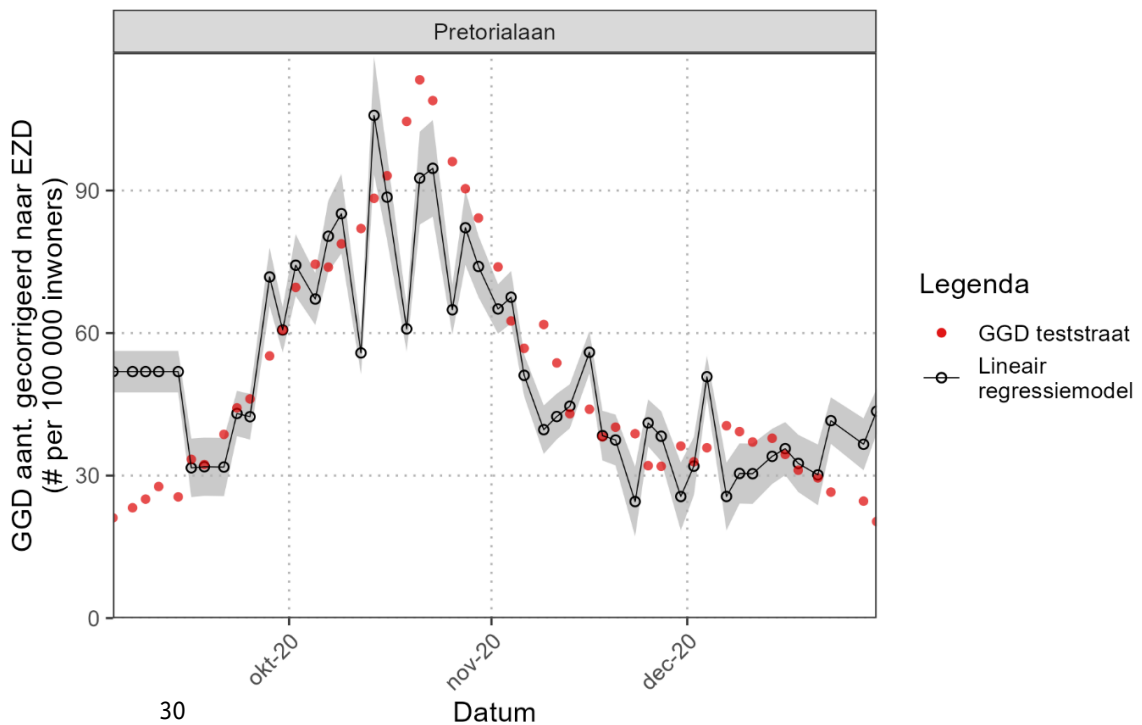
waarin  $a$  de slope is en  $b$  de intercept.

Tabel 3.5 toont de modelparameters en  $R^2$  voor de modellen per deelgebied. Voor een groot aantal deelgebieden liggen de modelparameters dicht bij elkaar, maar voor Katendrecht, Ommoord en Rozenburg wijken deze flink af en is de  $R^2$  ook fors lager. Dit hangt voor een belangrijk deel samen met het gebiedsgrootte effect, waarbij het relatief beperkte aantal positieve testen in kleinere gebieden zorgt voor meer onzekerheid in het modelresultaat.

FIGUUR 3.14 AANTAL POSITIEVE TESTEN VERSUS CONCENTRATIE SARS-COV-2 RNA IN HUISHOUDELIJK AFVALWATER. VOOR DE DATUM VAN DE POSITIEVE TESTEN IS IN PLAATS VAN DE TESTDATUM DE EERSTE ZIEKTEDAG GEBRUIKT



FIGUUR 3.15 MODELRESULTAAT LINEAIR REGRESSIEMODEL VOOR RG PRETORIALAAN



**TABEL 3.5** OVERZICHT MODELPARAMETERS LINEAIR REGRESSIEMODEL EN R<sup>2</sup> PER DEELGEBIED OP BASIS VAN DATA TOT 3<sup>E</sup> WEEK JANUARI 2021

Locatie	Intercept b	Slope a	R <sup>2</sup>
rwzi Dokhaven - INF2	14,0	0,075	0,83
rwzi Dokhaven - INF3	10,7	0,074	0,87
rwzi Dokhaven - INF4	14,9	0,071	0,80
rwzi Dokhaven - INF5-6	14,8	0,077	0,81
Dokhaven totaal (gewogen gemiddelde van INF2, 3,4 en 5-6)	11,6	0,080	0,89
RG Pretoriaaan	14,4	0,079	0,83
RG Katendrecht (na correctie aantal inwoners)	27,2	0,106	0,43
RG Ommoord	21,5	0,041	0,52
rwzi Rozenburg	10,9	0,130	0,52

### 3.4.3 TRENDANALYSE ALFA VARIANT: JANUARI 2021-JUNI 2021

Op 6 januari 2021 werd de eerste vaccinatie gezet en later in de maand begon de dominantie van de Alfa variant. Vanaf 23 januari 2021 werd de avondklok ingevoerd als onderdeel van nog strengere maatregelen en vanaf 31 maart kwamen zelftesten ter beschikking. Zie voor meer informatie de tijdlijn uit bijlage III.

Het lineaire regressiemodel dat in de vorige paragraaf is beschreven begon naarmate meer data ter beschikking kwam steeds minder goede resultaten te geven. Uit analyse van de modelresultaten kwam naar voren dat net voor de kerstvakantie een groot aantal mensen zich heeft laten testen, wellicht om met een veilig gevoel naar het kerstdiner te kunnen. Een tegenovergestelde situatie vond plaats eind januari 2021, waar vanwege sneeuwval en winterweer de aantallen testen juist een paar weken een stuk lager lagen. Het lineaire regressiemodel houdt geen rekening met de invloed van dit menselijk gedrag, waardoor het modelresultaat steeds minder goed werd. Om dit te ondervangen is de parameter ‘aantal uitgevoerde testen’ toegevoegd aan het rekenmodel. Het aantal testen reflecteert de testbeschikbaarheid en testbereidheid en biedt het rekenmodel daarmee de mogelijkheid om te ‘corrigeren’ voor menselijk gedrag. Het rekenmodel is daarmee van een lineair regressiemodel doorontwikkeld naar een meervoudig lineair regressiemodel uit vergelijking (6):

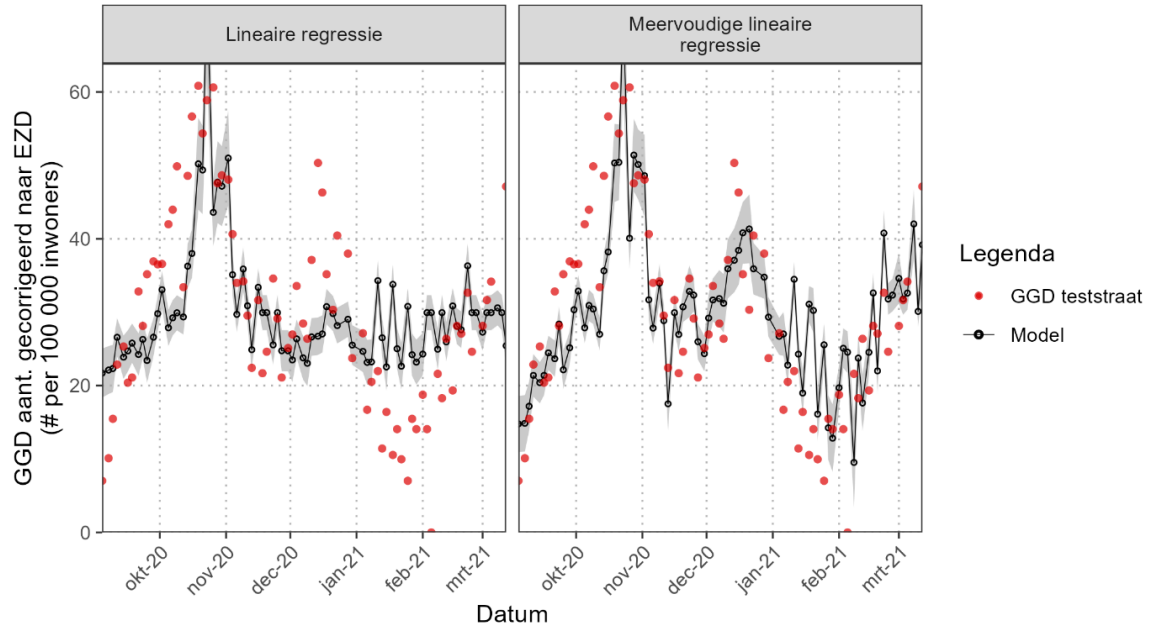
$$\text{aantal positieve testen} = a * \text{concentratie rioolwater} + b * \text{aantal testen} + c \quad (6)$$

Waarin  $a$  en  $b$  de slopes zijn en  $c$  de intercept.

Figuur 3.16 geeft de resultaten voor deelgebied Ommoord. Duidelijk zichtbaar is dat het meervoudig lineaire regressiemodel zowel de ‘kerstbump’ als de dip tijdens de sneeuwperiode een stuk beter pakt dan het lineaire regressiemodel. De R<sup>2</sup> neemt daarbij toe van 0,48 naar 0,67, een significante verbetering.



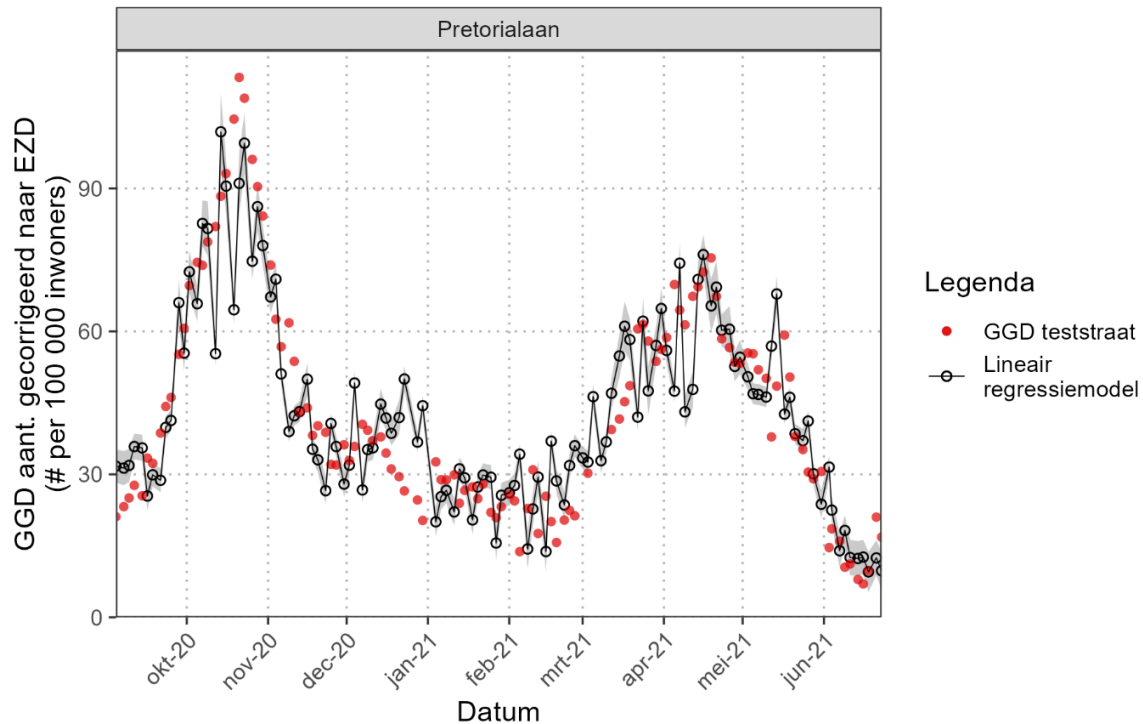
FIGUUR 3.16 MODELRESULTAAT OMMOORD: LINEAIR REGRESSIEMODEL (LINKS) EN MEERVOUDIG LINEAIR REGRESSIEMODEL (RECHTS)



In de loop van het voorjaar 2021 werd het effect van vaccinaties vanaf eind mei 2021 steeds duidelijker zichtbaar in een afnemend aantal besmettingen. Figuur 3.17 toont de aantallen positieve testen en het gemodelleerde aantal positieve testen voor deelgebied Pretoria. De  $R^2$  van het meervoudig lineair regressiemodel bedroeg bij deze figuur 0,84, waaruit volgt dat het rekenmodel zowel de 2<sup>e</sup> golf als de daarop volgende golf van de Alfa variant goed kon modelleren, ook terwijl de vaccinatiegraad sterk was toegenomen van 0 op 1 januari 2021 tot 11,9 miljoen mensen (66,7%) met minimaal een prik en 8,9 miljoen (51,3%) met twee prikken (volledig gevaccineerd) op 30 juli 2021.

Tabel 3.6 geeft een overzicht van de modelparameters en modelprestatie voor alle deelgebieden. Duidelijk zichtbaar is dat de modelparameters meer van elkaar verschillen dan bij het lineaire regressiemodel, waardoor de geldingskracht van de modelparameters afneemt. Voor de invloed van de testbereidheid is dit geen probleem, omdat dit juist het gebiedspecifieke gedrag van de populatie ondervangt. Voor de slope  $a$ , die de invloed van de rioolmetingen bepaalt, is dit geen gewenste ontwikkeling omdat het, redenerend vanuit het onderliggende proces, een bepaalde vracht aan SARS-CoV-2 RNA equivalent zou moeten zijn met een bepaald aantal besmette personen. Dit is de reden dat in de volgende periode is ingestoken op de ontwikkeling van een meer formeel rekenmodel, waarbij het rioolwaterdeel onafhankelijk is van het deelgebied.

FIGUUR 3.17 MODELRESULTAAT MEERVOUDIG LINEAIR REGRESSIEMODEL VOOR PRETORIALAAN

TABEL 3.6 OVERZICHT MODELPARAMETERS MEERVOUDIG LINEAIR REGRESSIEMODEL EN R<sup>2</sup> PER DEELGEBIED OP BASIS VAN DATA TOT LAATSTE WEEK JUNI 2021

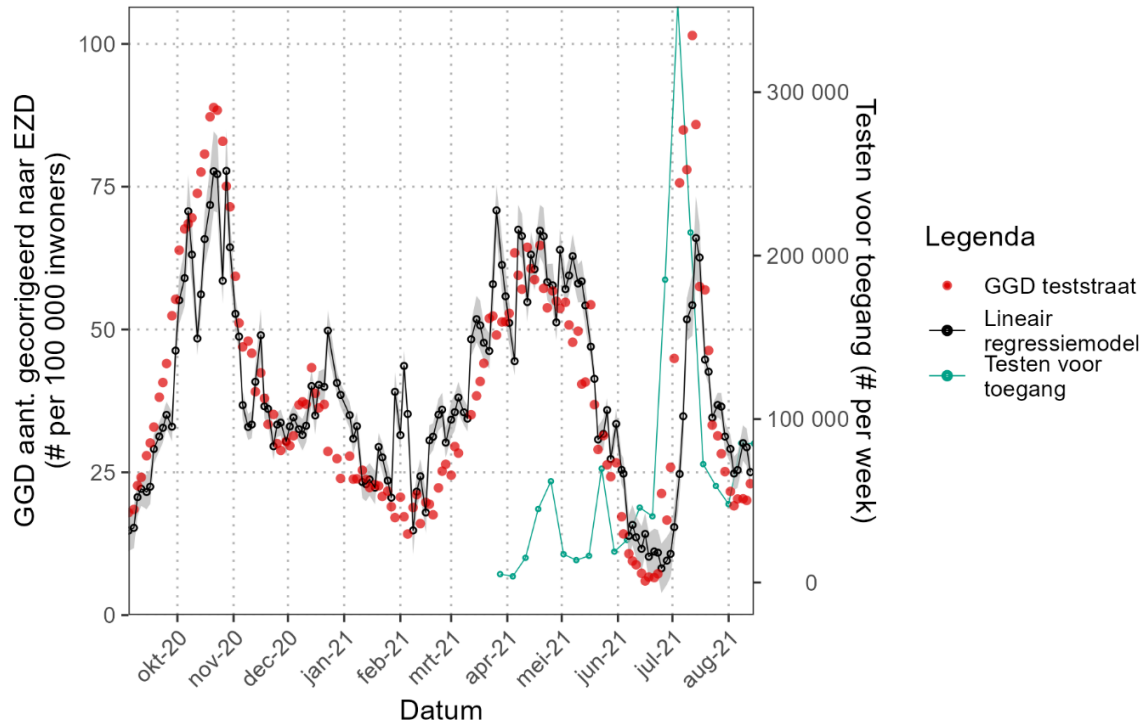
Locatie	Intercept c	Slope a (rioolwater)	Slope b (aantal testen)	R <sup>2</sup>
rwzi Dokhaven - INF2	8,0	0,070	0,028	0,75
rwzi Dokhaven - INF3	-0,1	0,056	0,087	0,82
rwzi Dokhaven - INF4	12,2	0,064	0,013	0,72
rwzi Dokhaven - INF5-6	4,0	0,071	0,043	0,82
Dokhaven totaal (gewogen gemiddelde van INF2, 3,4 en 5-6)	3,9	0,074	0,040	0,87
RG Pretoriaaan	-0,6	0,071	0,085	0,84
RG Katendrecht (na correctie aantal inwoners)	17,2	0,098	0,060	0,43
RG Ommoord	3,7	0,034	0,086	0,75
rwzi Rozenburg	5,4	0,046	0,084	0,53
RG Bergschenhoek	19,9	0,072	0,006	0,40

#### 3.4.4 TRENDANALYSE DELTA VARIANT: JULI 2021-NOVEMBER 2021

Eind juni 2021 markeert het einde van de periode waarin de Alfa variant dominant was en waarna de Delta variant dominant werd. Dankzij de sterk dalende besmettingsaantallen werd het openingsplan voortvarend opgepakt met 'testen voor toegang'. Deze testen werden uitgevoerd door commerciële aanbieders, waardoor deze geen onderdeel uitmaakten van de GGD data uit teststraten. Eind juni is echter ook het moment van de 'Dansen met Jansen' uitglijder van de overheid, waarin werd gesuggereerd dat je direct na een vaccinatie kon gaan feesten met een sterke toename van het aantal besmettingen als gevolg. Vanaf 10 juli werden weer strenge maatregelen ingevoerd, zoals een sluiting van de nachthoreca. Zie voor meer informatie de tijdslijn uit bijlage III.

Figuur 3.18 toont de resultaten van het meervoudig lineaire regressiemodel voor de periode tot half augustus 2021. Duidelijk zichtbaar is dat het rekenmodel over de hele linie tot goede resultaten leidt, maar dat dit de ‘Dansen met Jansen piek’ heel slecht beschrijft. In de figuur is ook het aantal ‘testen voor toegang’ opgenomen, hetgeen de kortstondige opening van de horeca reflecteert met een sterke toename eind juni en forse daling vanaf de strengere maatregelen op 10 juli 2021. Daaruit hebben we afgeleid dat de mismatch in deze periode vooral te wijten zou zijn aan de sterke toename van het aantal testen overall en het aantal positieve testen onder met name jongeren.

FIGUUR 3.18 MODELRESULTAAT MEERVOUDIG LINEAIR REGRESSIEMODEL VOOR DOKHAVEN TOTAAL EN DE AANTALLEN TESTEN VOOR TOEGANG IN NEDERLAND PER WEEK



Om de nadelen van het meervoudig lineaire regressiemodel te ondervangen is een meer formele modelbenadering gevolgd met het opstellen van een ‘mixed model met autoregressief component’. Dit model is weergegeven in vergelijking 7:

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_{1ij} + (\beta_2 + b_{2j}) x_{2ij} + \epsilon_{ij} + \rho \epsilon_{j,i-1} \quad (7)$$

Waarin:

$y_{ij}$  = doelvariabele: het aantal positieve testen op dag  $i$  in gebied  $j$

$\beta_0$  = intercept

$\beta_1 \cdot$  = slope concentratie SARS-CoV 2 RNA in huishoudelijk afvalwater

$\beta_2$  = slope aantal testen per 100.000 inwoners

$x_1 \cdot$  = concentratie SARS-CoV 2 RNA in huishoudelijk afvalwater

$x_2$  = totaal aantal testen per 100,000 inwoners op 1e ziektedag

$b_{2j}$  = random slope om locatiespecifieke invloed aantal testen mee te nemen.

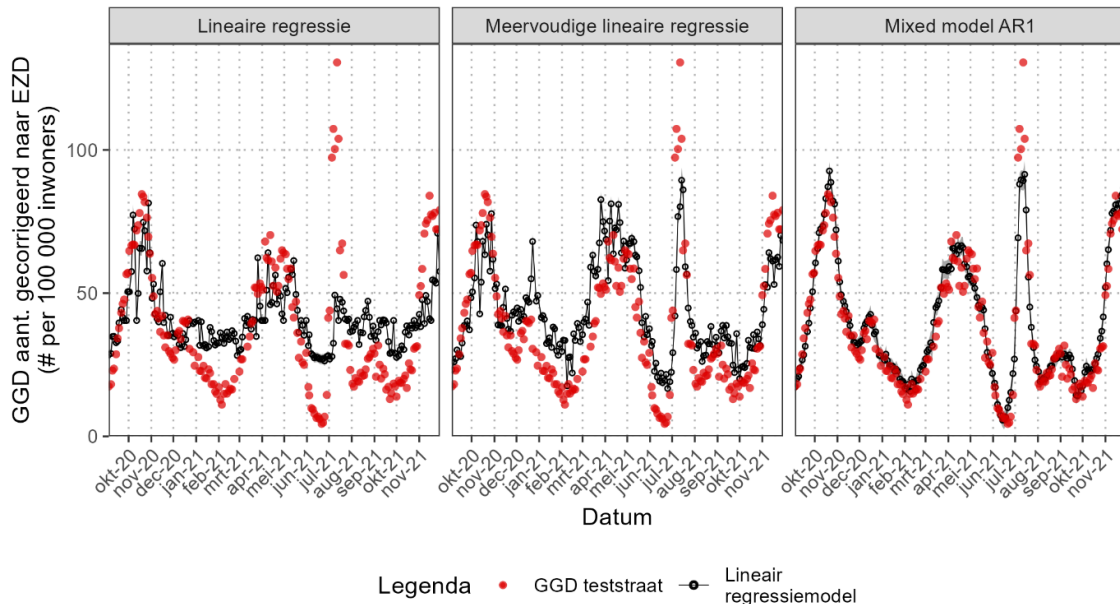
$\epsilon_{ij}$ , = error term

$\rho \epsilon_{j,i-1}$  = eerste orde autoregressie component, die corrigeert voor autoregressie

Voor zowel de random slope  $b_{2j}$  als de error term  $\epsilon_{ij}$  geldt de aanname dat deze normaal verdeeld zijn volgens  $b_{2j} \sim N(0, \sigma_b^2)$  en  $\epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_\epsilon^2)$ , waarbij de laatste een standaard afwijking heeft die varieert per deelgebied. Het model is gemaakt met behulp van de INLA package in R Version 4.2.1, dat gebruik maakt van geïntegreerde geneste Laplace-benaderingen.

Figuur 3.19 toont de vergelijking van de drie toegepaste modelconcepten op de gehele dataset tot 1 december 2021 voor het deelgebied INF5-6. Het lineaire regressiemodel heeft een redelijke fit, maar is niet in staat om periodes met afwijkend testgedrag, zoals kerst 2020, de sneeuwval februari 2021, de lage aantallen positieven in juni 2021 en de Dansen met Jansen piek goed te beschrijven. Het multi lineaire regressiemodel is hier beter toe in staat, maar is niet goed in staat om de sterke toename in oktober en november 2021 te beschrijven. Het laatste model geeft een stabiel beeld door de toevoeging van een autoregressief component en is in staat om alle relevante dynamiek met uitzondering van ‘Dansen met Jansen’ te beschrijven.

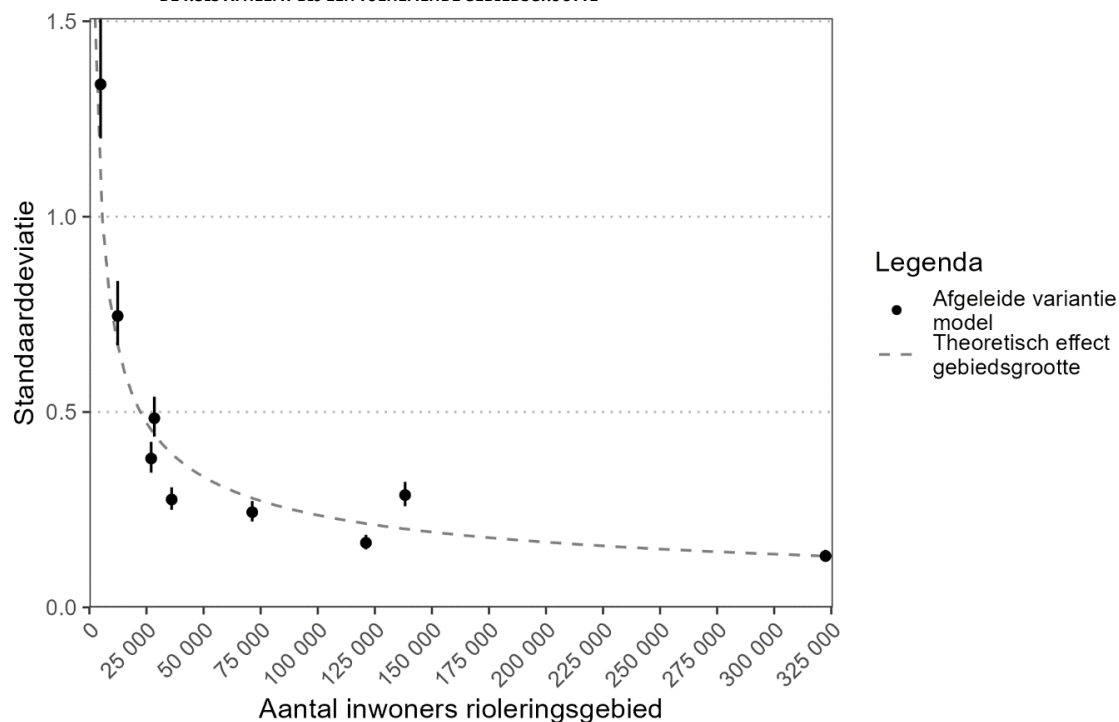
FIGUUR 3.19 VERGELIJKING MODELCONCEPTEN OP COMPLETE DATASET



Figuur 3.20 toont dat de spreiding in de gegevens, ofwel de ruis, per meetgebied verschilt. De resulterende modelonzekerheid wordt voornamelijk bepaald door de variantie in de aantallen positieve testen, waarbij deze variantie voor kleinere gebieden conform de theorie veel sterker doorwerkt dan in grotere gebieden. Vanaf een gebiedsgrootte van 25.000 personen is de bevolkingsomvang geen beperking voor een goede modelkwaliteit, daaronder wordt de modelprestatie hierdoor sterk beperkt.

Of het model gevoelig is voor de heersende SARS-CoV-2 variant is onderzocht door de dominante variant toe te voegen als modelparameter. In totaal werden drie kenmerkende periodes onderscheiden: de periode waarin geen variant-of-concern (VoC) aanwezig was, ofwel de periode van 1 september 2020 tot 31 december 2020, de periode met de alfa variant van 26 februari 2021 tot 13 juni 2021 en de periode van de delta variant van 23 juli tot 23 november. Geen van de dominante varianten varieerden statistisch significant van elkaar. Het is dus mogelijk alle drie de periodes te beschrijven met één gezamenlijk model.

FIGUUR 3.20 OVERZICHT VAN DE MEETRUIS PER GEBIED. DE STIPPELLIJN IS HET THEORETISCHE EFFECT VAN DE STEEKPROEFGROOTTE, WAARBIJ DE RUIS AFNEEMT BIJ EEN TOENEMENDE GEBIEDSGROOTTE



#### 3.4.5 TRENDANALYSE OMIKRON VARIANT: DECEMBER 2021-MAART 2022

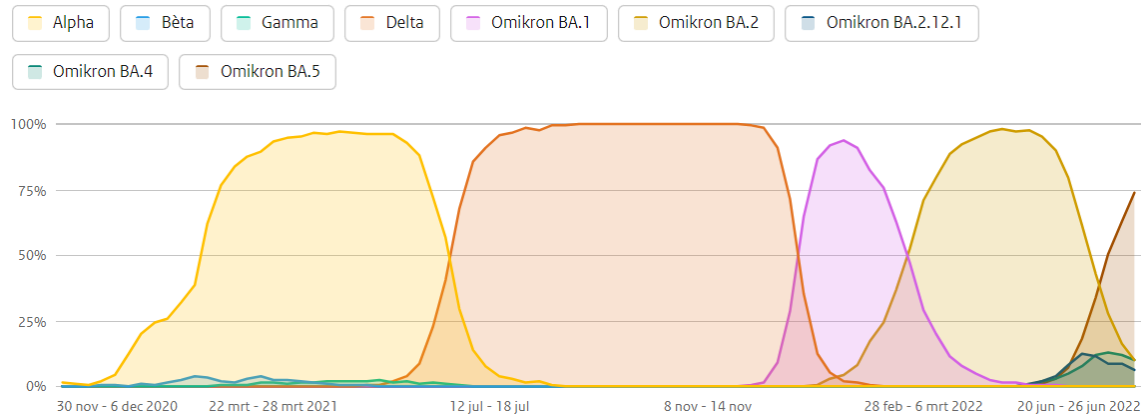
Vanaf eind november 2021 kwam de eerste Omikron-variant (B.A1) op, die vanwege de veel grotere besmettelijkheid tot een forse toename van besmettingen met als gevolg verscherping van de maatregelen in de loop van december 2021 en een lockdown vanaf 19 december. Gelukkig bleek Omikron wel erg besmettelijk, maar ook gepaard te gaan met een minder ernstig ziekteverloop. Dit heeft er toe geleid dat de maatregelen in januari werden versoepeld met als gevolg in februari een nieuwe all-time high aantal positieve testen. Zie voor meer informatie de tijdlijn uit bijlage III.

Het rekenmodel uit vergelijking 7 bleek niet langer in staat om de relatie tussen rioolmetingen en aantal positieve testen te leggen. Dit lag deels aan de lagere uitscheiding van virus deeltjes door patiënten met de Omikron variant en deels aan het veranderde testbeleid, waarbij op zeer grote schaal gebruik werd gemaakt van zelftesten. Vanaf 11 april was zelfs geen bevestigingstest meer noodzakelijk na een positieve zelftest. Dit maakt dat het vanaf 11 april nauwelijks meer mogelijk is om met behulp van de teststraat data het verloop van de pandemie te monitoren, terwijl dit nog steeds wel mogelijk is met behulp van rioolmetingen.

De lagere uitscheiding van de Omikron variant is op een aantal manieren geanalyseerd. KWR heeft voor een deel van de rioolwatermonsters met digitale droplet qPCR geanalyseerd welke variant aanwezig was in het rioolwater en welk aandeel deze variant had op de in totaal aangetroffen hoeveelheid SARS-CoV-2 RNA. Door dit in de loop van de tijd te doen, ontstaat een S-curve die de opkomst van Omikron in rioolwater laat zien. Het RIVM heeft in dezelfde periode op basis van materiaal van positieve testen (Kiemsurveillance) een vergelijkbare S-curve opgesteld, die het aandeel Omikron in de populatie laat zien. Deze is opgenomen in figuur 3.21. Door deze 2 curves, opgenomen in figuur 3.22, onderling te vergelijken kan worden bepaald hoe de uitscheiding met Omikron zich verhoudt tot die van Delta. Hieruit volgde dat deze ongeveer 1/3 was.

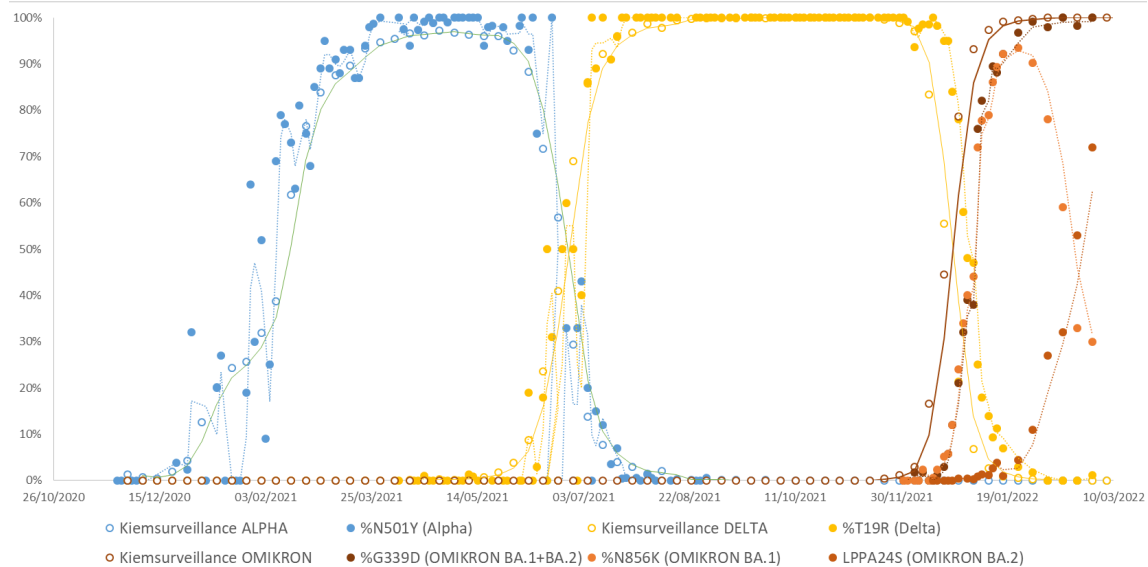
Onafhankelijk van deze berekening is het rekenmodel uit vergelijking 7 gebruikt om de verminderde uitscheiding van Omikron in te schatten. Dit is gedaan door aan het rekenmodel de S-curve uit figuur 3.21 mee te nemen, waaruit volgt per week welk percentage van de populatie nog besmet was met Delta en welk deel van de populatie besmet was met Omikron. Voor het deel van de populatie dat besmet was met Omikron is in het model een te bepalen 'sheddingfactor' opgenomen en iteratief is bepaald hoe groot deze factor is om de relatie tussen aantallen testen en het rioolwater te kunnen blijven leggen. Uit deze analyse volgde een verminderde uitscheiding van ten minste 50%, hetgeen aardig overeenkomt met de eerdere inschatting op basis van figuur 3.22.

**FIGUUR 3.21** DOMINANTE SARS-COV-2 VARIANT IN POPULATIE



Waarde van maandag 11 juli - Bron: RIVM

**FIGUUR 3.22** VERGELIJKING AANWEZIGE VARIANTEN IN RIOOLWATER IN VERGELIJKING MET AANWEZIGE VARIANTEN IN POPULATIE

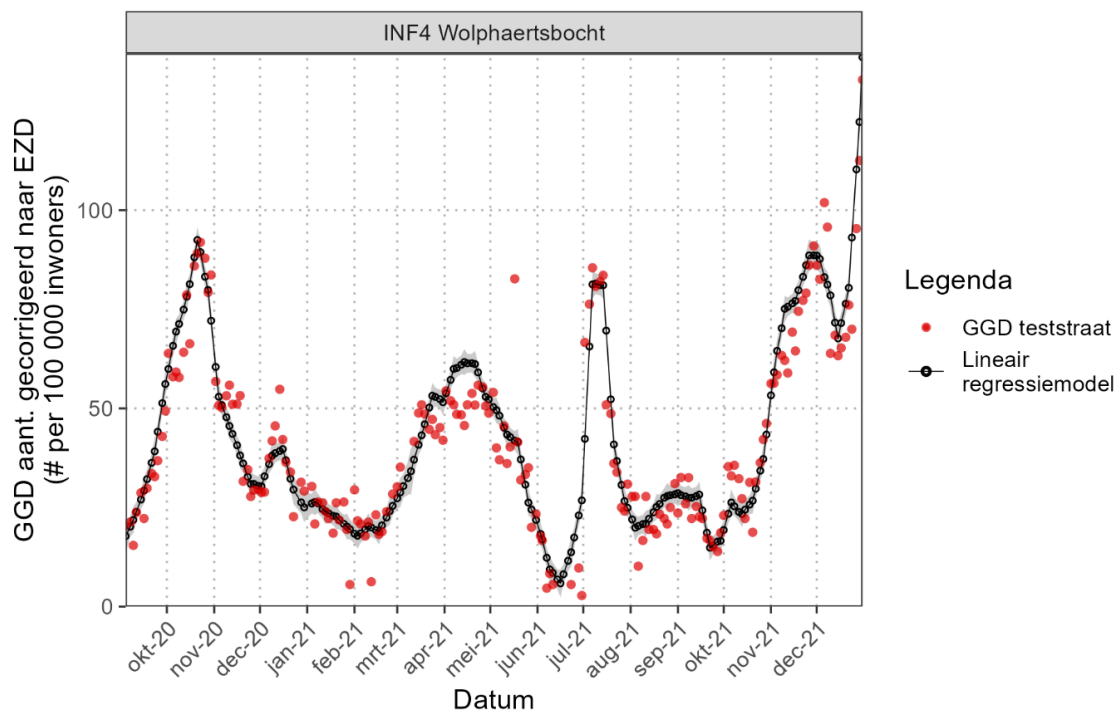


Daarnaast is aan het rekenmodel een extra variabele toegevoegd: 'het aantal positieve testen na een positieve test elders', hetgeen een zelftest kan zijn, maar ook testen voor toegang of testen voor een reis. Deze gegevens bleken reeds te worden geregistreerd als onderdeel van de teststraatdatabase. Door dit mee te nemen is het mogelijk om te corrigeren voor het feit dat door de zelftesten (en testen voor toegang) in feite een veel groter deel van de populatie werd getest dan alleen in de teststraten. Het resultaat van deze aanpassing is opgenomen in figuur 3.23. Met de laatste modelaanpassing bleek het ineens mogelijk om ook de aantallen

positieve testen in de ‘dansen met jansen’ piek goed te beschrijven. In die periode was immers het aantal testen voor toegang, zie figuur 3.18, zeer hoog en daarmee ook de testdichtheid van de gehele populatie.

Het blijkt voor de gehele onderzoeksperiode mogelijk om op basis van het rioolwater, aangevuld met informatie over aantal testen, het aandeel Omikron en het aantal testen elders, het aantal positieve testen in de teststraten te beschrijven. Het aandeel rioolwater in het modelresultaat varieert daardoor over de periode, maar is altijd een dominant (> 50%) aandeel van het berekende signaal.

FIGUUR 3.23 MODELRESULTAAT INCLUSIEF ONZEKERHEIDSMARGE VOOR PERIODE SEPTEMBER 2020-JANUARI 2022



#### 3.4.6 TRENDANALYSE: HUISARTSENBEZOEKEN

Het verzorgingsgebied van huisartsenpraktijken is over het algemeen veel kleiner dan dat van hoofdrioolgemalen of rwzi's. In het Rotterdam-Rijnmond project is voor een aantal locaties overlap tussen de metingen en de huisartsenpraktijken. Dit geldt voor Rozenburg, Katendrecht, Pretoriaaan en Ommoord.

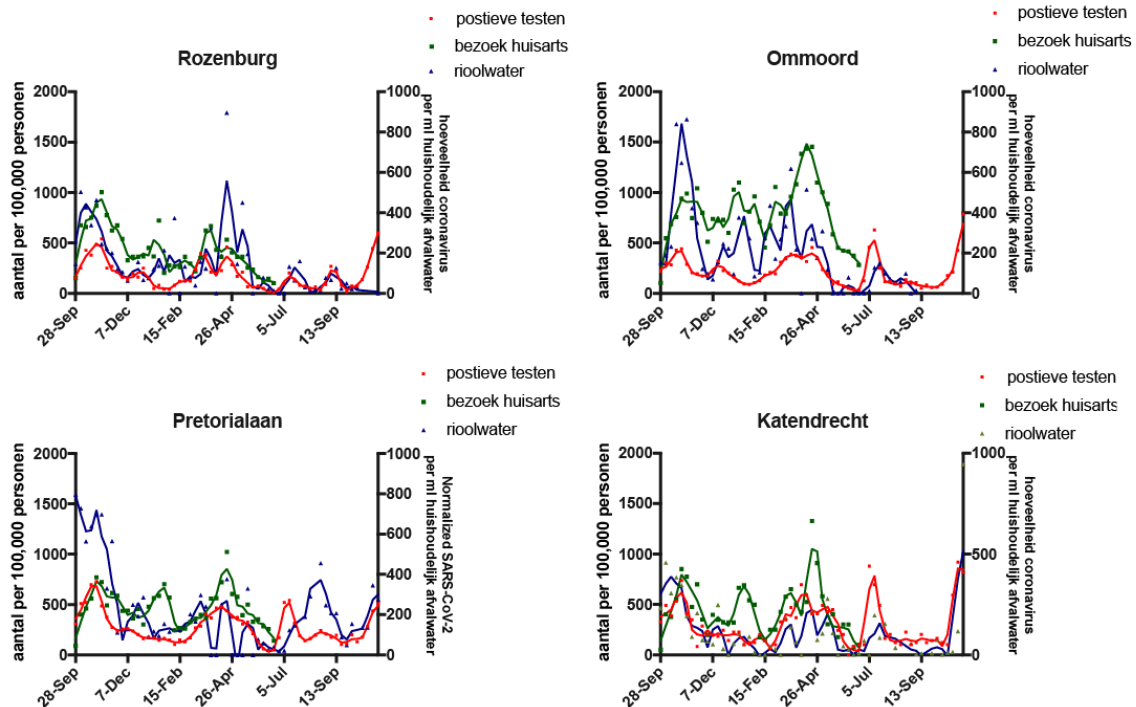
De klinische registratie van huisartsenpraktijken is gemonitord om te bepalen of een toename van SARS coronavirus positieve mensen in een wijk resulteert in een toename van patiënten die contact opnemen met de huisarts met luchtwegklachten. Dit hebben heeft Erasmus MC gedaan via de Rijnmond Gezond database. Rijnmond Gezond verzamelt gegevens die de huisarts standaard vastlegt. Deze gegevens worden zonder dat de personen herkenbaar zijn, verstuurd naar de onderzoek database.

Er heeft tweemaal een extractie van de Rijnmond Gezond database plaatsgevonden, hetgeen data heeft opgeleverd voor de periode juli 2020 tot en met juni 2021. Hieruit bleek dat de codes die huisartsen gebruiken voor “coronavirus” en “andere infectie(s) luchtwegen” gebruikt kunnen worden om te monitoren hoeveel mensen met COVID-19 klachten bij de huisartsen komen.

Wanneer een duidelijke toename is van het aantal SARS-CoV-2 deeltjes in het riool, of het

aantal SARS-CoV-2 positieve testen in de teststraten, dan is er ook een toename van mensen met COVID-19 klachten bij de huisartsen, zie figuur 3.24.

**FIGUUR 3.24 HET AANTAL POSITIEVE SARS-COV-2 TESTEN (ROOD) EN COVID-19 GERELATEERDE HUISARTSBEZOEKEN (GROEN) 100.000 PERSONEN PER WEEK VOOR DE PERIODE SEPTEMBER 2020-NOVEMBER 2021. HOEVEELHEDEN SARS-COV-2 IN HET RIOOLWATER (BLAUW)**



### 3.4.7 TRENDANALYSE: ZIEKENHUISOPNAMEN

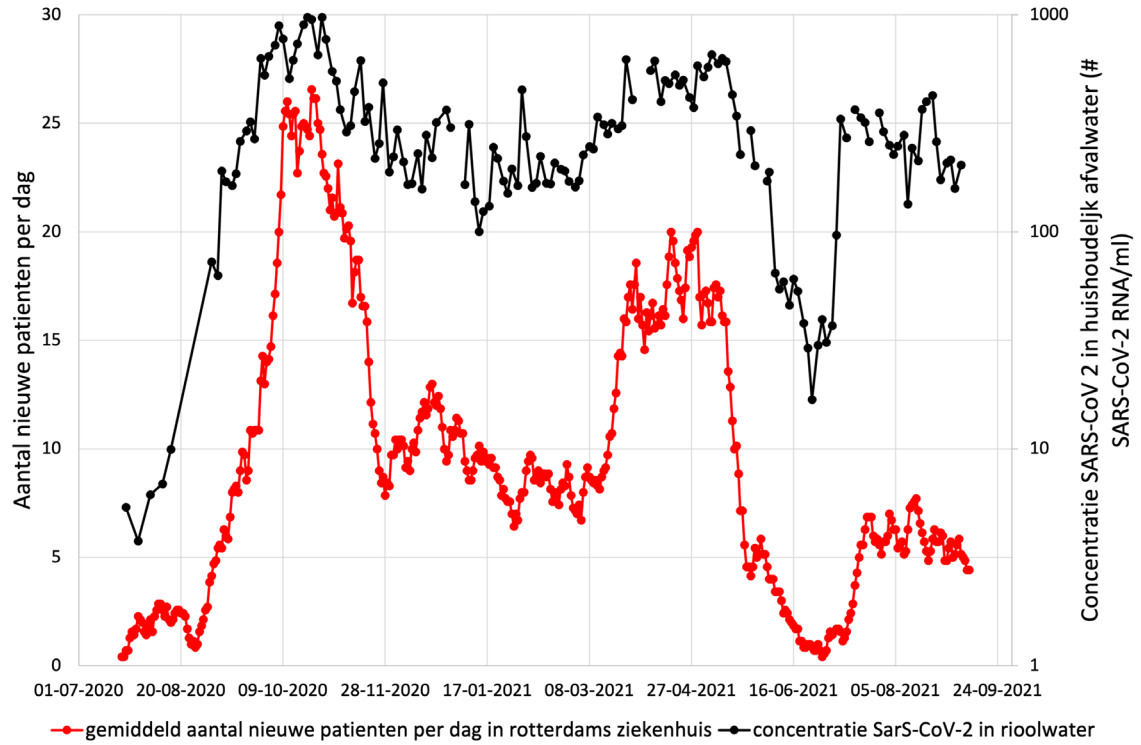
De opname in de ziekenhuizen is de bovenste laag in de infectie pyramide. Ziekenhuizen hebben een verzorgingsgebied dat veel groter is dan een bemalingsgebied en vanwege de verdeling van patiënten tussen ziekenhuizen onderling is het niet eenvoudig om een directe relatie te leggen tussen rioolwater in ziekenhuisopname voor een klein gebied. De ziekenhuis data zijn afkomstig uit de open dataset 'Covid-19 ziekenhuisopnames (volgens NICE registratie) per gemeente per ziekenhuisopnamedatum en meldingsdatum', die is gedownload via <https://data.overheid.nl/dataset/14845-covid-19-ziekenhuisopnames--volgens-nice-registratie--per-gemeente-per-ziekenhuisopnamedatum-e#panel-resources>. Uit deze dataset is het totale aantal opgenomen patiënten per dag voor heel Rotterdam bepaald en in figuur 3.25 vergeleken met de genormaliseerde rioolwatermetingen van rwzi Dokhaven. Rwwi Dokhaven behandelt het rioolwater van ongeveer de helft van de populatie. De ziekenhuisdata beslaan daarmee een groter gebied dan de rioolmetingen.

De ziekenhuisdata volgt in de zomer 2020 de trend in het rioolwater met enige vertraging. Dit is conform verwachting, aangezien het enige tijd duurt voordat mensen na een besmetting opgenomen moeten worden.. Vanaf eind april 2021 begint het effect van de dan al 4 maanden lopende vaccinatiecampagne zich ook duidelijk door te vertalen naar het aantal ziekenhuisopnames, terwijl de rioolmetingen (en ook de aantallen positieve testen) nog zeker twee weken lang verder opliepen. Tijdens de 'dansen met jansen' piek liep het aantal testen en de rioolmetingen zeer snel op en duurde het weer een paar weken voordat het aantal ziekenhuisopnames ook begon op te lopen.



Deze resultaten laten zien dat elke laag in de infectiepyramide een eigen, kenmerkend verloop heeft en het meerwaarde biedt om verschillende soorten data met elkaar in verband te brengen. Ziekenhuisopnames vormen een hard getal, maar deze lopen bij oplopende aantallen achter op de rioolmetingen.

**FIGUUR 3.25** OPNAME NIEUWE PATIËNTEN IN ZIEKENHUIS IN ROTTERDAM VERGELEKEN MET DE CONCENTRATIE SARS-COV 2 IN RIOOLWATER RWZI DOKHAVEN. COVID-19 ZIEKENHUISOPNAMES (VOLGENS NICE REGISTRATIE) PER GEMEENTE PER ZIEKENHUISOPNAMEDATUM EN MELDINGSDATUM, GEDOWNLOAD VIA [HTTPS://DATA.OVERHEID.NL/](https://data.overheid.nl/)



# 4

## CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

De conclusies zijn per deel van het rapport opgenomen, gevolgd door aanbevelingen.

### 4.1 DEEL I. IS RIOOLWATER EEN BRON VAN BESMETTING VOOR SARS-COV-2?

Deel I is op basis van een literatuurstudie uitgevoerd aan de hand van drie vragen.

1. Is SARS-CoV-2 in ontlasting en rioolwater nog infectieus en in staat ziekte te veroorzaken?  
Op basis van het uitgevoerde onderzoek is geconcludeerd dat SARS-CoV-2 in ontlasting nauwelijks infectieus is en in rioolwater niet infectieus is.
2. Hoe lang blijft SARS-CoV-2 (RNA) in rioolwater aanwezig?  
Op basis van het onderzoek is geconcludeerd dat SARS-CoV-2 RNA langdurig in rioolwater aanwezig blijft. De duur is afhankelijk van de temperatuur. Experimenten bij KWR lieten zien dat 90% reductie wordt bereikt na ongeveer 18 dagen bij een temperatuurrange van 5-15 graden en 9 dagen bij een temperatuur van 25 graden. In primair slib blijft het virus RNA nog aanzienlijk langer aanwezig.
3. Hoe goed wordt SARS-CoV-2 RNA verwijderd door de rioolwaterzuivering en wordt er in effluent nog SARS-CoV-2 RNA aangetroffen en vormt dat een risico voor bv zwemmers?  
Op basis van metingen en literatuuronderzoek is geconcludeerd dat op een rioolwaterzuivering een afbraak van ongeveer 1,2 Log plaatsvindt. Bij hoge aantallen in het influent, kan nog steeds een aanzienlijke concentratie in het effluent aanwezig zijn. Dit gaat om virus RNA, niet om infectieuze SARS-CoV-2 virussen.

### 4.2 DEEL II. RIOOLWATERSURVEILLANCE

Het deelonderzoek rioolwatersurveillance heeft een schat aan resultaten en (nieuwe) inzichten opgeleverd voor alle betrokken disciplines. Het onderzoek heeft laten zien dat de state of the art als het gaat om monsternamen, laboratoriumtechnieken, normalisatie en trendanalyse toereikend is om snel en adequaat informatie op te leveren die gebruikt kan worden om het verloop van een pandemie te volgen en om tijdig maatregelen te treffen. Door de nauwe samenwerking tussen de water- en gezondheidssector in dit project, heeft de GGD de meerwaarde van rioolwater-surveillance gezien (early warning, objectieve indicator, variants-of-concern) en heeft rioolwatersurveillance een prominente plek gegeven in hun evaluatie van de pandemische situatie en het nemen van maatregelen. In meerdere momenten tijdens de pandemie werd het rioolwater-signaal gebruikt om de beoordelen of trends in de testdata 'werkelijk' waren of vooral ingegeven door veranderingen in testgedrag. De maatregel om testbussen en een informatiecampagne te dirigeren naar Charlois kwamen mede uit de rioolwater-surveillance naar voren.

Inhoudelijk gezien heeft het project de volgende inzichten opgeleverd:

- Driemaal per week bemonsteren is afdoende om trends in de besmettingen via het rioolwater tijdig over een periode van twee weken te kunnen detecteren. De periode van twee weken is tijdens de pandemie bijvoorbeeld door de EU aangehouden bij besluitvorming over reisrestricties. Het driemaal per week bemonsteren compenseert voor het verlies aan monsters door monsternamenfouten of analyseproblemen.

- Een percentage ‘goed geanalyseerde monsters’ van ruim 80% is haalbaar gebleken. In totaal is voor ongeveer 8% van de bemonsteringen geen monster beschikbaar door uiteenlopende oorzaken. De beschikbaarheid bij tijdelijke meetopstellingen bij rioolgemalen en reguliere opstellingen bij het influent van de rwzi vertoont nauwelijks verschil. Op het kwaliteitscriterium ‘er mag niet meer dan 7,5% afwijking zitten in het monsternamevolume in het monsternamevat, is wel een duidelijk verschil tussen beide opstellingen: bij tijdelijke meetopstellingen lag dit gemiddeld op 13,6% en bij reguliere opstellingen op 6,0%.
- Normalisatie op basis van debiet is over het algemeen een betrouwbare methode om de monsters te normaliseren voor een variabele mate van verdunning. In iets minder dan 1% van de gevallen, voornamelijk door gemaalstoringen, leidt dit tot een onjuiste normalisatie. Gemaalstoringen komen gemiddeld 13 keer per jaar voor en hebben een gemiddelde duur van 10 uur, ofwel 1,5% van de tijd. De meeste gemaalstoringen zijn van korte duur en hebben dan nauwelijks effect op een 24 uren monstername. Alleen bij lange gemaalstoringen, waardoor een aanzienlijk deel van het rioolwater niet meer aankomt binnen de reguliere 24 uren periode, leidt een pompstoring wel tot een onjuiste normalisatie indien normalisatie alleen op basis van debiet plaatsvindt. Om dit te onderwerpen kan de goedkoop te meten parameter geleidbaarheid worden gebruikt, maar ook crAssphage blijkt hiervoor geschikt.
- CrAssphage is een zeer goede, ook kwantitatieve, indicator voor de aanwezigheid van humane fecaliën in een watermonster. Dit maakt crAssphage geschikt als indicator om te controleren of de basisaanname in WBE “wastewater based epidemiology”, namelijk dat het aantal inwoners representatief is voor het aantal uitscheiders, te controleren, hetgeen speelt in vakantieperiodes en in toeristische gebieden. Tevens biedt dit de mogelijkheid om crAssphage te gebruiken als normalisator in situaties waarin debietmetingen ontbreken, hetgeen in landen zonder rwzi’s doorgaans het geval is, of indien gemeten wordt op plekken bovenstrooms in rioolstelsels, zoals rioolputten of huisaansluitingen. Op dergelijke locaties is debietmeting lastig en kan crAssphage worden gebruikt om te normaliseren.
- De stand der techniek is zo ver dat sequencing van virusdeeltjes in rioolwater of digitale droplet qPCR gebruikt kan worden om virusvarianten in het rioolwater aan te tonen en te kwantificeren. Dit levert een snelle surveillance op van VoC opkomst met een hoge ruimtelijke resolutie ten opzichte van de Kiemsurveillance.
- Rioolwatersurveillance is betrouwbaar genoeg om dit als bouwsteen te gebruiken voor het volgen van een pandemie als onderdeel van de infectiepyramide. Het rioolwater is goed te linken aan positieve testen, huisartsenbezoeken en ziekenhuisopnames.
- Statistische modellering is essentieel bij de analyse van de relatie tussen rioolmetingen en bovengrondse data, zoals aantallen testen. De in dit project gevolgde aanpak waarin steeds is gekozen voor het meest eenvoudige model dat de relatie beschrijft is een vruchtbare aanpak gebleken in een situatie waarin de dataset elke week groeit en waarin niemand weet waar de epidemie naar toe gaat. Frequent, dus elke 2 weken, updaten bleek essentieel om de meetgegevens te relateren aan de actuele situatie. Dit levert snel inzicht, ondanks dat de tijd ontbreekt voor het opstellen van een gedetailleerde en formele modelaanpak.
- Rioolmetingen blijken opvallend consistent tijdens de onderzoeksperiode, terwijl de aantallen testen sterk afhankelijk zijn gebleken van menselijk gedrag, met als belangrijkste factoren de testbeschikbaarheid, testbereidheid, testen elders (testen voor toegang) en de beschikbaarheid van zelftesten. Deze menselijke invloed is de reden dat het statistische rekenmodel steeds weer doorontwikkeld moest worden. De riooldata bieden in feite de bril waarmee de aantallen positieve testen moeten worden geïnterpreteerd.
- Rioolwatersurveillance is in de onderzoeksperiode ‘volwassen’ geworden en doorontwikkeld van een tool van wetenschappers naar een tool voor de praktijk.

### 4.3 AANBEVELINGEN

Het onderzoek heeft naast de hiervoor beschreven resultaten ook de volgende aanbevelingen opgeleverd:

- Rioolwatersurveillance is een relatief nieuwe manier om waarde, in dit geval informatie, uit afvalwater te halen. Deze waarde wordt groter naarmate meer informatie van gemeenten en waterschappen over het achterliggende gebied en de kwaliteit van de meetopzet en monsternamen samen komt met de informatie uit de laboratoriumanalyse. De aanbeveling voor toekomstige rioolwatersurveillance is om de bijdrage vanuit gemeenten en waterschappen meer te laten zijn dan alleen het aanleveren van een 'potje rioolwater' en rioolwatersurveillance te zien als een gezamenlijke, multidisciplinaire activiteit.
- crAssphage is een goede, kwantitatieve, marker voor het aantal uitscheiders in het bovengstrooms van het monsternamenpunt gelegen gebied. Wij bevelen aan om de potentie van crAssphage als kwantitatieve marker verder te exploreren binnen de sector, bijvoorbeeld in discrepantiestudies of voor het opsporen van foutaansluitingen in regenwaterriolen.
- SARS-CoV-2 bleek gelukkig niet meer infectieus in het rioolwater, maar dat geldt niet voor alle ziekteverwekkers en wellicht ook niet voor een toekomstig virus. De aanbeveling is om alert te blijven op mogelijke transmissie van ziekteverwekkers via de riolerings- en de rwzi.
- Rioolwatersurveillance is goed uitvoerbaar op rwzi's en bij rioolgemalen. Dit is echter niet altijd het schaalniveau waar de informatiebehoefte van de GGDs ligt indien zij willen ingrijpen bij een uitbraak van een besmettelijke ziekte. De aanbeveling is om nader onderzoek te doen naar de schaalbaarheid van rioolwatersurveillance in tijd en ruimte en te zoeken hoe de informatiebehoefte van de GGD gevoed kan worden met informatie vanuit rioolwater.

## 5

## REFERENTIES

Ahmed, Warish, Kyle Bibby, Patrick M D'Aoust, Robert Delatolla, Charles P Gerba, Charles N Haas, Kerry A Hamilton, Joanne Hewitt, Timothy R Julian, Devrim Kaya, Paul Monis, Laurent Moulin, Colleen Naughton, Rachel T Noble, Abhilasha Shrestha, Ananda Tiwari, Stuart L Simpson, Sebastien Wurtzer, and Aaron Bivins. 2021. 'Differentiating between the possibility and probability of SARS-CoV-2 transmission associated with wastewater: empirical evidence is needed to substantiate risk', *FEMS Microbes*, 2.

Ahmed, Warish, Paul M. Bertsch, Kyle Bibby, Eiji Haramoto, Joanne Hewitt, Flavia Huygens, Pradip Gyawali, Asja Korajkic, Shane Riddell, Samendra P. Sherchan, Stuart L. Simpson, Kwanrawee Sirikanchana, Erin M. Symonds, Rory Verhagen, Seshadri S. Vasana, Masaaki Kitajima, and Aaron Bivins. 2020. 'Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology', *Environ Res*, 191: 110092.

Ahmed, W., Tschärke, B., Bertsch, P. M., Bibby, K., Bivins, A., Choi, P., Clarke, L., Dwyer, J., Edson, J., Nguyen, T. M. H., O'Brien, J. W., Simpson, S. L., Sherman, P., Thomas, K. V., Verhagen, R., Zaugg J., Mueller J. F. (2020). SARS-CoV-2 RNA monitoring in wastewater as a potential early warning system for COVID-19 transmission in the community: A temporal case study. *Sci. Total Environ.* 761: 144216. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144216

Ai, Y., Davis, A., Jones, D., Lemeshow, S., Tu, H., He, F., Ru, P., Pan, X., Bohrerova, Z., Lee, J. (2021). Wastewater SARS-CoV-2 monitoring as a community-level COVID-19 trend tracker and variants in Ohio, United States. *Sci. Total Environ.* 801:149757. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149757.

Albert, S., A. Ruíz, J. Pemán, M. Salavert, and P. Domingo-Calap. 2021. 'Lack of evidence for infectious SARS-CoV-2 in feces and sewage', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 40: 2665-67.

Ballesté, E., Pascual-Benito, M., Martín-Díaz, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., Jofre, J., García-Aljaro, C. (2019). Dynamics of crAssphage as a human source tracking marker in potentially faecally polluted environments. *Water Research* 155 p233-244. DOI: 10.1016/j.watres.2019.02.042.

Betancourt, W.Q., Schmitz, B.W., Innes, G.K., Prasek, S.M., Pogreba Brown, K.M., Stark, E.R., Foster, A.R., Sprissler, R.S., Harris, D.T., Sherchan, S.P., Gerba, C.P., Pepper, I.L. (2021). COVID-19 containment on a college campus via wastewater-based epidemiology, targeted clinical testing and an intervention. *Sci. Total Environ.* 779:146408. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146408.

Bivins, A., Crank, K., Greaves, J., North, D., Wu, Z., Bibby, K. (2020) Cross-assembly phage and pepper mild mottle virus as viral water quality monitoring tools—potential, research gaps, and way forward. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 16 p54-61. DOI: 10.1016/j.coesh.2020.02.001.

Bivins, Aaron, Justin Greaves, Robert Fischer, Kwe Claude Yinda, Warish Ahmed, Masaaki Kitajima, Vincent J. Munster, and Kyle Bibby. 2020. 'Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater', *Environmental Science & Technology Letters*: acs.estlett.0c00730.

Blaak, H., Kemper, M.A., de Man, H., van Leuken, J.P.g., Schijven, J.F., van Passel, M.W.J., Schmitt, H., de Roda Husman, A.M. (2021). Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing Enterobacterales in Dutch municipal wastewater, *Science of The Total Environment*, 776 – 145925 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145925>.

Castiglioni, S., Thomas, K.V., Kasprzyk-Hordern, B., Vandam, L., Griffiths, P. (2014). Testing wastewater to detect illicit drugs: state of the art, potential and research needs. *Sci. Total Environ.* 487, p613-620. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.034.

CBS, 2020. Central Bureau of Statistics in the Netherlands. [https://cbsinuwbuurt.nl/#sub-buurten2020\\_aantal\\_inwoners](https://cbsinuwbuurt.nl/#sub-buurten2020_aantal_inwoners) (accessed March 2022).

Cerrada-Romero, Cristina, Judith Berastegui-Cabrera, Pedro Camacho-Martínez, Josune Goikoetxea-Aguirre, Patricia Pérez-Palacios, Sonia Santibáñez, María José Blanco-Vidal, Adoración Valiente, Jorge Alba, Regino Rodríguez-Álvarez, Álvaro Pascual, José Antonio Oteo, José Miguel Cisneros, Jerónimo Pachón, Inmaculada Casas-Flecha, Elisa Cordero, Francisco Pozo, and Javier Sánchez-Céspedes. 2022. 'Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19', *Scientific Reports*, 12: 7397.

Crank, K., Xiang, L., North, D., Bonanno Ferraro, G., Iaconelli, M., Mancini, P., La Rosa, G., Bibby, K. (2020). CrAssphage abundance and correlation with molecular viral markers in Italian wastewater. *Water Research* 184: 116161. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116161.

Das Adhikari, Upasana, George Eng, Mara Farcasanu, Laura E Avena, Manish C Choudhary, Virginia A Triant, Meaghan Flagg, Abigail E Schiff, Isabella Gomez, Leah M Froehle, Thomas J Diefenbach, Larance Ronsard, Daniel Lingwood, Grace C Lee, Seyed Alireza Rabi, Derek Erstad, George Velmahos, Jonathan Z Li, Richard Hodin, James R Stone, Anna N Honko, Anthony Griffiths, Ömer H Yilmaz, and Douglas S Kwon. 2021. 'Fecal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-Cov-2) RNA Is Associated With Decreased Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Survival', *Clinical Infectious Diseases*, 74: 1081-84.

Davo, L., Seguí, R., Botija, P., Beltr, M.J., Albert, E., Torres, I., Lopez-Fernandez, P.A., Ortí, R., Maestre, J.F. Sanchez, G., Navarro, D. (2021). Early detection of SARS-CoV-2 infection cases or outbreaks at nursing homes by targeted wastewater tracking. *Clinical Microbiology and Infection* 27 (2021) p1061-1063. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.02.003.

De Graaf, M., Langeveld, J., Post, J., Balmont, C.C., Franz, E., Izquierdo-Lara, R.W., Fanoy, E., de Schepper, E.I.T., Koopmans, M.P.G., Medema, G.J. (in preparation). Capturing the SARS-CoV-2 infection pyramid within the municipality of Rotterdam.

de Oliveira, Leonardo Camilo, Andrés Felipe Torres-Franco, Bruna Coelho Lopes, Beatriz Senra Álvares da Silva Santos, Erica Azevedo Costa, Michelle S. Costa, Marcus Tullius P. Reis, Marília C. Melo, Rodrigo Bicalho Polizzi, Mauro Martins Teixeira, and César Rossas Mota. 2021. 'Viability of SARS-CoV-2 in river water and wastewater at different temperatures and solids content', *Water Res.* 195: 117002.

Dürrenmatt, D. J., Del Giudice, D., & Rieckermann, J. (2013). Dynamic time warping improves sewer flow monitoring. *water research*, 47(11), 3803-3816.

Edwards, R.A., Vega, A.A., Norman, H.M., Ohaeri, M., Levi, K., Dinsdale, E. A., ... , Dutilh, B. E. (2019). Global phylogeography and ancient evolution of the widespread human gut virus crAssphage. *Nature microbiology*, 4(10), p1727-1736. DOI: 10.1038/s41564-019-0494-6.

Foladori, Paola, Francesca Cutrupi, Maria Cadonna, and Serena Manara. 2022. 'Coronaviruses and SARS-CoV-2 in sewerage and their removal: Step by step in wastewater treatment plants', *Environ Res*, 207: 112204.

Fongaro, Gislaine, Paula Rogovski, Beatriz Pereira Savi, Rafael Dorighello Cadamuro, Juliana Virginia Faria Pereira, Iago Hashimoto Sant Anna, Ivan Henrique Rodrigues, Doris Sobral Marques Souza, Edgard Gregory Torres Saravia, David Rodríguez-Lázaro, and Maria Célia da Silva Lanna. 2021. 'SARS-CoV-2 in Human Sewage and River Water from a Remote and Vulnerable Area as a Surveillance Tool in Brazil', *Food and Environmental Virology*.

Gao, J., Banks, A., Li, J., Jiang, G., Lai, F.Y., Mueller, J.F., Thai, P.K. (2017). Evaluation of in-sewer transformation of selected illicit drugs and pharmaceutical biomarkers. *Sci. Total Environ*. 609: 1172-1181. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.231.

Gasperi, J., Sebastian, C., Ruban, V., Delamain, M., Percot, S., Wiest, L., Mirande, C., Caupos, E., Demare, D., Diallo Kessoo, M., Saad, M., Schwartz, J.J. Dubois, P., Fratta, C., Wolff, H., Moilleron, R., Chebbo, G., Cren, C., Millet, M., Barraud, S., Gromaire, M.C. (2014). Micropollutants in urban stormwater: occurrence, concentrations, and atmospheric contributions for a wide range of contaminants in three French catchments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:5267–5281. DOI: 10.1007/s11356-013-2396-0.

Gerba, C. (2021) personal communication.

Graber, T.E., Mercier, E., Bhatnagar, K., Fuzzen, M., D'Aoust, P.M., Hoang, H.D., Tian, X., Towhid, S.T., Plaza-Diaz, J., Eid, W., Alain, T., Butler, A., Goodridge, L., Servos, M., Delatolla, R. (2021). Near real-time determination of B.1.1.7 in proportion to total SARS-CoV-2 viral load in wastewater using an allele-specific primer extension PCR strategy. *Water Research* 205:117681. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117681.

Guo, Meng, Wanyin Tao, Richard A. Flavell, and Shu Zhu. 2021. 'Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18: 269-83.

Haramoto, E., B. Malla, O. Thakali, and M. Kitajima. 2020. 'First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan', *Science of the Total Environment*, 737.

Heijnen, L., Elsinga, G.S., de Graaf, M., Molenkamp, R., Koopmans, M.P.G., Medema, G.J. (2021). Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater. *Sci. Total Environ*. 799: 149456. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149456.

Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 10, 1124 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>

Heneghan CJ, Spencer EA, Brassey J, et al. SARS-CoV-2 and the role of airborne transmission: a systematic review. *F1000Res*. 2021;10:232.

Hillary, L.S., Farkas, K., Maher, K.H., Lucaci, A., Thorpe, J., Distaso, M.A., Gaze, W.H., Paterson, S., Burke, T., Connor, T.R., McDonald, J.E., Malham, S.K., Jones, D.L. (2020). Monitoring SARS-CoV-2 in municipal wastewater to evaluate the success of lockdown measures for controlling COVID-19 in the UK. *Water Research* 200:117214. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117214.

Ho, J., Stange, C., Suhrborg, R., Wurzbacher, C., Drewes, J.E., Tiehm A. (2021). SARS-CoV-2 wastewater surveillance in Germany: long-term PCR monitoring, suitability of primer/probe combinations and biomarker stability. *Water Research* 210: 117977. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117977.

Hokajärvi, Anna-Maria, Annastiina Rytönen, Ananda Tiwari, Ari Kauppinen, Sami Oikarinen, Kirsi-Maarit Lehto, Aino Kankaanpää, Teemu Gunnar, Haider Al-Hello, Soile Blomqvist, Ilkka T. Miettinen, Carita Savolainen-Kopra, and Tarja Pitkänen. 2021. 'The detection and stability of the SARS-CoV-2 RNA biomarkers in wastewater influent in Helsinki, Finland', *Science of the Total Environment*, 770: 145274.

Honap, T.P., Sankaranarayanan, K., Schnorr, S.L., Ozga, A.T., Warinner, C., et al. (2020). Biogeographic study of human gut-associated crAssphage suggests impacts from industrialization and recent expansion. *PLoS One* 15(1): e0226930. DOI: 10.1371/journal.pone.0226930.

<https://www.h2owaternetwerk.nl/h2o-actueel/rioolwateranalyse-kwr-drugsgebruik-in-amsterdam-gedaald-in-coronatijd>. 17 juni 2020

Jahn, K., Dreifuss, D., Topolsky, I., Kull, A., Ganesanandamoorthy, P., Fernandez-Cassi, X., Bänziger, C., Devaux, A.J., Stachler, E., Caduff, L., Cariti, F., Corzón, A.T., Fuhrmann, L., Chen, C., Jablonski, K.P., Nadeau, S., Feldkamp, M., Beisel, C., Aquino, C., Stadler, T., Ort, C., Kohn, T., Julian, T.R., Beerenwinkel, N. (2022). Early detection and surveillance of SARS-CoV-2 genomic variants in wastewater using COJAC. *Nat. Microbiol.* 7(8):1151-1160. DOI: 10.1038/s41564-022-01185-x.

Jeong, H. W., S. M. Kim, H. S. Kim, Y. I. Kim, J. H. Kim, J. Y. Cho, S. H. Kim, H. Kang, S. G. Kim, S. J. Park, E. H. Kim, and Y. K. Choi. 2020. 'Viable SARS-CoV-2 in various specimens from COVID-19 patients', *Clin Microbiol Infect*, 26: 1520-24.

Jones, D. L., M. Q. Baluja, D. W. Graham, A. Corbishley, J. E. McDonald, S. K. Malham, L. S. Hillary, T. R. Connor, W. H. Gaze, I. B. Moura, M. H. Wilcox, and K. Farkas. 2020. 'Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19', *Sci Total Environ*, 749: 141364.

Kang, M., J. Wei, J. Yuan, J. Guo, Y. Zhang, J. Hang, Y. Qu, H. Qian, Y. Zhuang, X. Chen, X. Peng, T. Shi, J. Wang, J. Wu, T. Song, J. He, Y. Li, and N. Zhong. 2020. 'Probable Evidence of Fecal Aerosol Transmission of SARS-CoV-2 in a High-Rise Building', *Ann Intern Med*, 173: 974-80.

Kim, J. M., H. M. Kim, E. J. Lee, H. J. Jo, Y. Yoon, N. J. Lee, J. Son, Y. J. Lee, M. S. Kim, Y. P. Lee, S. J. Chae, K. R. Park, S. R. Cho, S. Park, S. J. Kim, E. Wang, S. Woo, A. Lim, S. J. Park, J. Jang, Y. S. Chung, B. S. Chin, J. S. Lee, D. Lim, M. G. Han, and C. K. Yoo. 2020. 'Detection and Isolation of SARS-CoV-2 in Serum, Urine, and Stool Specimens of COVID-19 Patients from the Republic of Korea', *Osong Public Health Res Perspect*, 11: 112-17.

Kirby, A.E., Walters, M.S., Jennings, W.C., Fugitt, R., LaCross, N., Mattioli, M., Marsh, Z.A., Roberts, V.A., Mercante, J.W., Yoder, J., Hill, V.R. (2021). Using Wastewater Surveillance Data to Support the COVID-19 Response - United States, 2020-2021. *Morb. Mortal. Weekly Rep.* 70(36):1242-1244. DOI: 10.15585/mmwr.mm7036a2.



Kolarević, Stoimir, Adrienn Micsinai, Réka Szántó-Egész, Alena Lukács, Margareta Kračun-Kolarević, Lian Lundy, Alexander K. T. Kirschner, Andreas H. Farnleitner, Aleksandar Djukic, Jasna Čolić, Tanja Nenin, Karolina Sunjog, and Momir Paunović. 2021. 'Detection of SARS-CoV-2 RNA in the Danube River in Serbia associated with the discharge of untreated wastewaters', *Science of the Total Environment*, 783: 146967.

Kumar, M., K. Kuroda, A. K. Patel, N. Patel, P. Bhattacharya, M. Joshi, and C. G. Joshi. 2021. 'Decay of SARS-CoV-2 RNA along the wastewater treatment outfitted with Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) system evaluated through two sample concentration techniques', *Sci Total Environ*, 754: 142329.

Lamers, M. M., J. Beumer, J. van der Vaart, K. Knoops, J. Puschhof, T. I. Breugem, R. B. G. Ravelli, J. Paul van Schayck, A. Z. Mykytyn, H. Q. Duimel, E. van Donselaar, S. Riesebosch, H. J. H. Kuijpers, D. Schipper, W. J. van de Wetering, M. de Graaf, M. Koopmans, E. Cuppen, P. J. Peters, B. L. Haagmans, and H. Clevers. 2020. 'SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes', *Science*, 369: 50-54.

Launay, M.A., Dittmer, U., Steinmetz, H. (2016). Organic micropollutants discharged by combined sewer overflows - Characterisation of pollutant sources and stormwater-related processes. *Water Research* 104: p82-92. DOI: 10.1016/j.watres.2016.07.068.

Lodder, W., and A. M. de Roda Husman. 2020. 'SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source', *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 5: 533-34.

Maidana-Kulesza, María Noel, Hugo Ramiro Poma, Diego Gastón Sanguino-Jorquera, Sarita Isabel Reyes, María del Milagro Said-Adamo, Juan Martín Mainardi-Remis, Dolores Gutiérrez-Cacciabue, Héctor Antonio Cristóbal, Mercedes Cecilia Cruz, Mónica Aparicio González, and Verónica Beatriz Rajal. 2022. 'Tracking SARS-CoV-2 in rivers as a tool for epidemiological surveillance', *Science of the Total Environment*, 848: 157707.

McKinney, K. R., Y. Y. Gong, and T. G. Lewis. 2006. 'Environmental transmission of SARS at Amoy Gardens', *J Environ Health*, 68: 26-30; quiz 51-2.

Medema, G.J., Been, F., Heijnen, L., Petterson, S. (2020a). Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 17: 49-71. DOI: 10.1016/j.coesh.2020.09.006.

Medema, G.J., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., Brouwer, A. (2020b). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7(7): 511-516. DOI: 10.1021/acs.estlett.0c00357.

Mulder, M., van Voorthuizen, E., Langeveld, J. (2020). Verwijdering van organische microverontreinigingen. STOWA rapport 2020-06.

NEN (2019). Nederlandse Norm 6600-1:2019. Water - Monsterneming - Deel 1: Afvalwater (in Dutch: Dutch Standard 6600-1:2019. Water - Sampling - Part 1: Wastewater).

Nieuwenhuijse, D. F., & Koopmans, M. P. (2017). Metagenomic sequencing for surveillance of food-and waterborne viral diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8, 230.

Ort, C., Lawrence, M.G., Reungoat, J., Mueller, J.F. (2010). Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) p6289–6296. DOI: 10.1021/es100778d.

Pedersen, Rune M., Ditte S. Tornby, Line L. Bang, Lone W. Madsen, Marianne N. Skov, Thøger G. Jensen, Isik S. Johansen, and Thomas E. Andersen. 2021. 'Rectally shed SARS-CoV-2 lacks infectivity: time to rethink faecal–oral transmission?', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18: 669-69.

Prado, T., Fumian, T.M., Mannarino, C.F., Resende, P.C., Motta, F.C., Eppinghaus, A.L.F., Chagas do Vale, V.H., Braz, R.M.S., de Andrade, J.d.S.R., Maranhão, A.G., Miagostovich M.P. (2021). Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water research* 191: 116810-116810. DOI: 10.1016/j.watres.2021.116810.

Raaben, M., Einerhand, A.W.C., Taminiau, L.J.A., van Houdt, M., Bouma, J., Raatgeep, R.H., Büller, H.A., de Haan, C.A.M., Rossen, J.W.A. (2007). Cyclooxygenase activity is important for efficient replication of mouse hepatitis virus at an early stage of infection. *Virology journal* 4:55. DOI: 10.1186/1743-422X-4-55.

Rimoldi, S. G., F. Stefani, A. Gigantiello, S. Polesello, F. Comandatore, D. Mileto, M. Maresca, C. Longobardi, A. Mancon, F. Romeri, C. Pagani, F. Cappelli, C. Roscioli, L. Moja, M. R. Gismondo, and F. Salerno. 2020. 'Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers', *Science of the Total Environment*, 744.

RIONED (2013). Riolering in beeld. Benchmark riolering 2013 (in Dutch: Basic sewer information in the Netherlands ). Stichting RIONED, Ede, the Netherlands.

Rios, G., Lacoux, C., Leclercq, V., Diamant, A., Lebrigand, K., Lazuka, A., Soyeux, E., Lacroix, S., Fassy, J., Couesnon, A., Thiery, R., Mari, B., Pradier, C., Waldmann, R., Barbry, P. (2021). Monitoring SARS-CoV-2 variants alterations in Nice neighborhoods by wastewater nanopore sequencing. *Lancet Reg. Health Eur.* 10: 100202. DOI: 10.1016/j.lanepe.2021.100202.

Rodríguez Rasero, F.J., Moya Ruano, L.A., Rasero Del Real, P., Cuberos Gómez, L., Lorusso, N. (2022). Associations between SARS-CoV-2 RNA concentrations in wastewater and COVID-19 rates in days after sampling in small urban areas of Seville: A time series study. *Sci. Total Environ.* 806(Pt 1):150573. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150573.

Roldan-Hernandez, Laura, Katherine E. Graham, Dorothea Duong, and Alexandria B. Boehm. 2022. 'Persistence of Endogenous SARS-CoV-2 and Pepper Mild Mottle Virus RNA in Wastewater-Settled Solids', *ACS ES&T Water*.

Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., Cartmell, E. (2015). The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45(17), p1827-1879. DOI: 10.1080/10643389.2014.1000761

Rothman, J.A., Loveless, T.B., Kapcia III, J., Adams, E.D., Steele, J.A., Zimmer-Faust, A.G., Langlois, K., Wanless, D., Griffith, M., Mao, L., Chokry, J., Griffith, J.F., Whiteson, K.L. (2021). RNA Viromics of Southern California Wastewater and Detection of SARS-CoV-2 Single-Nucleotide Variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 87(23), e01448-21. DOI: 10.1128/AEM.01448-21.

Schang, C., Crosbie, N.D., Nolan, M., Poon, R., Wang, M., Jex, A., John, N., Baker, L., Scales, P., Schmidt, J., Thorley, B.R., Hill, K., Zamyadi, A., Tseng, C.-W., Henry, R., Kolotelo, P., Langeveld, J., Schilperoord, R., Shi, B., Einsiedel, S., Thomas, M., Black, J., Wilson, S., McCarthy, D.T. (2021). Passive Sampling of SARS-CoV-2 for Wastewater Surveillance. *Environ. Sci. Technol.* 55 (15): 10432-10441. DOI: 10.1021/acs.est.1c01530.

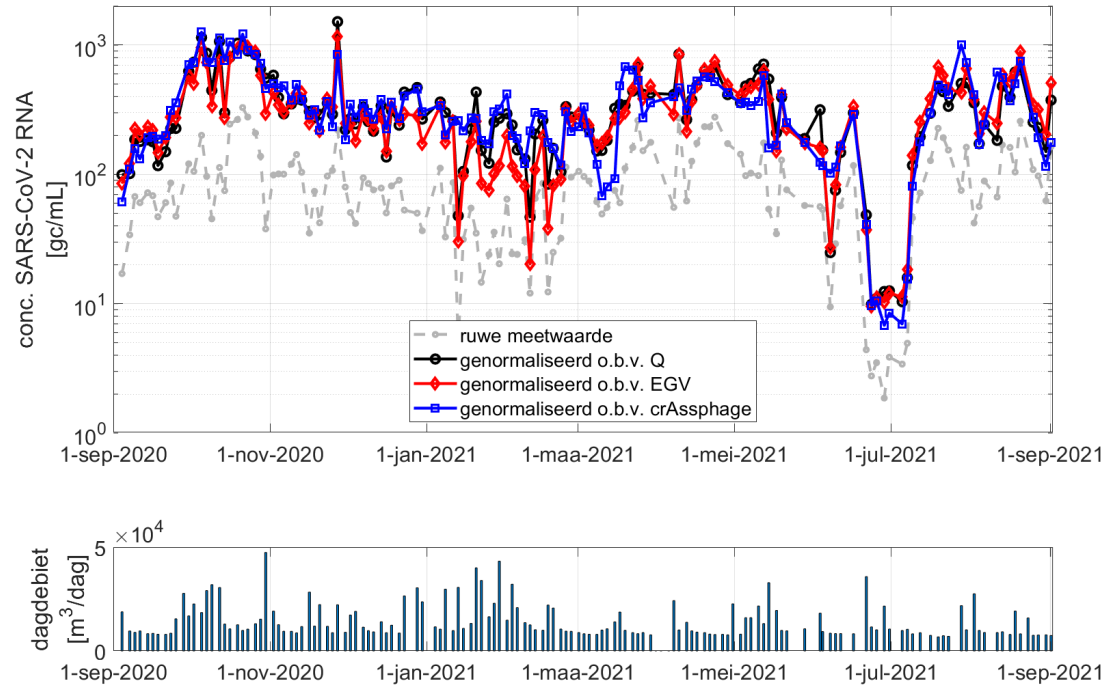
- Schilperoort, R.P.S., Dirksen, J., Langeveld, J.G., Clemens, F.H.L.R. (2012). Assessing characteristic time and space scales of in-sewer processes by analysis of one year of continuous in-sewer monitoring data. *Water Sci. Technol.* 66 (8): p1614-1620. DOI: 10.2166/wst.2012.115.
- Shkoporov, A.N., Clooney, A.G., Sutton, T.D.S., Ryan, F.J., Daly, K.M., Nolan, J.A., McDonnell, S.A., Khokhlova, E.V., Draper, L.A., Forde, A., Guerin, E., Velayudhan, V., Ross, R.P., Hill, C. (2019). The Human Gut Virome Is Highly Diverse, Stable, and Individual Specific. *Cell Host Microbe* 26(4): 527-541.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2019.09.009.
- Siranosian, B.A., Tamburini, F.B., Sherlock, G., Bhatt, A.S. (2020). Acquisition, transmission and strain diversity of human gut-colonizing crAss-like phages. *Nat. Commun.* 11(1):280. DOI: 10.1038/s41467-019-14103-3.
- Sobsey, Mark D. 2021. 'Absence of virological and epidemiological evidence that SARS-CoV-2 poses COVID-19 risks from environmental fecal waste, wastewater and water exposures', *Journal of Water and Health*, 20: 126-38.
- Stachler, E., Kelty, C., Sivaganesan, M. Li, X., Bibby, K., Shanks, O.C. (2017). Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement. *Environ. Sci. Technol.* 51(16): 9146-9154. DOI: 10.1021/acs.est.7b02703.
- Sweetapple, C., Melville-Shreeve, P., Chen, A.S., Grimsley, J.M.S., Bunce, J.T., Gaze, W., Fielding, S., Wade, M.J. (2021). Building knowledge of university campus population dynamics to enhance near-to-source sewage surveillance for SARS-CoV-2 detection. *Sci. Total Environ.* 806(Pt 1):150406. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150406.
- Taboada, B., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximenez, C., Arias, C.F. (2021). The gut virome of healthy children during the first year of life is diverse and dynamic. *PLoS One* 16(4): e0240958. DOI: 10.1371/journal.pone.0240958
- Tandukar, S., Sherchan, S.P., Haramoto, E. (2020). Applicability of crAssphage, pepper mild mottle virus, and tobacco mosaic virus as indicators of reduction of enteric viruses during wastewater treatment. *Sci. Rep.* 10:3616. DOI: 10.1038/s41598-020-60547-9.
- Van Der Avoort, H.G.A.M., Reimerink, J. H., Ras, J. A., Mulders, M. N. , Van Loon, A. M., (1995) Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* (1995). 114. 481-491 481
- Vosse, M. (2013). Rioolvremd water rioolwaterzuiveringsinrichting Dokhaven (in Dutch: Extraneous waters at wastewater treatment plant Dokhaven). Technical report of RoyalHaskoningDHV.
- Wang, Wenling, Yanli Xu, Ruqin Gao, Roujian Lu, Kai Han, Guizhen Wu, and Wenjie Tan. 2020. 'Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens', *JAMA*, 323: 1843-44.
- Weidhaas, Jennifer, Zachary T. Aanderud, D. Keith Roper, James VanDerslice, Erica Brown Gaddis, Jeff Ostermiller, Ken Hoffman, Rubayat Jamal, Phillip Heck, Yue Zhang, Kevin Torgersen, Jacob Vander Laan, and Nathan LaCross. 2021. 'Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds', *Science of the Total Environment*, 775: 145790.
- Weiß, G., Brombach, H., Haller, B. (2002). Infiltration and inflow in combined sewer systems: long-term analysis. *Water Sci. Technol.* 45(7): 11-19. DOI: 10.2166/wst.2002.0112.

- Westhaus, S., F. A. Weber, S. Schiwy, V. Linnemann, M. Brinkmann, M. Widera, C. Greve, A. Janke, H. Hollert, T. Wintgens, and S. Ciesek. 2021. 'Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks', *Science of the Total Environment*, 751.
- Wilder, M.L., Middleton, F., Larsen, D.A., Du, Q., Fenty, A., Zeng, T., Insaf, T., Kilaru, P., Collins, M., Kmush, B., Green, H.C. (2020). Co-quantification of crAssphage increases confidence in wastewater-based epidemiology for SARS-CoV-2 in low prevalence areas. *Water Res. X* 11:100100. DOI: 10.1016/j.wroa.2021.100100.
- Wolfe, M.K., Topol, A., Knudson, A., Simpson, A., White, B., Vugia, D.J., Yu, A.T., Li, L., Balliet, M., Stoddard, P., Han, G.S., Wigginton, K.R., Boehm, A.B. (2021). High-Frequency, High-Throughput Quantification of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Settled Solids at Eight Publicly Owned Treatment Works in Northern California Shows Strong Association with COVID-19 Incidence. *mSystems* 6(5): e00829-21. DOI: 10.1128/mSystems.00829-21.
- Wölfel, Roman, Victor M. Corman, Wolfgang Guggemos, Michael Seilmaier, Sabine Zange, Marcel A. Müller, Daniela Niemeyer, Terry C. Jones, Patrick Vollmar, Camilla Rothe, Michael Hoelscher, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Julia Schneider, Rosina Ehmann, Katrin Zwirgmaier, Christian Drosten, and Clemens Wendtner. 2020. 'Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019', *Nature*, 581: 465-69.
- Xiao, F., J. Sun, Y. Xu, F. Li, X. Huang, H. Li, J. Zhao, J. Huang, and J. Zhao. 2020. 'Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19', *Emerg Infect Dis*, 26: 1920-22.
- Xiao, Fei, Meiwen Tang, Xiaobin Zheng, Ye Liu, Xiaofeng Li, and Hong Shan. 2020. 'Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2', *Gastroenterology*, 158: 1831-33.e3.
- Yaniv, K., Shagan, M., Lewis, Y.E., Kramarsky-Winter, E., Weil, M., Indenbaum, V., Elul, M., Erster, O., Brown, A.S., Mendelson, E., Mannasse, B., Shirazi, R., Lakkakula, S., Miron, O., Rinott, E., Baibich, R.G., Bigler, I., Malul, M., Rishti, R., Brenner, A., Friedler, E., Gilboa, Y., Sabach, S., Alfiya, Y., Cheruti, U., Moran-Gilad, J., Berchenko, Y., Bar-Or, I., Kushmaro, A. (2021). City-level SARS-CoV-2 sewage surveillance. *Chemosphere* 283:131194. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131194.
- Zang, Ruochen, Maria Florencia Gomez Castro, Broc T. McCune, Qiru Zeng, Paul W. Rothlauf, Naomi M. Sonnek, Zhuoming Liu, Kevin F. Brulois, Xin Wang, Harry B. Greenberg, Michael S. Diamond, Matthew A. Ciorba, Sean P. J. Whelan, and Siyuan Ding. 2020. 'TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes', *Science Immunology*, 5: eabc3582.
- Zhang, Wei, Rong-Hui Du, Bei Li, Xiao-Shuang Zheng, Xing-Lou Yang, Ben Hu, Yan-Yi Wang, Geng-Fu Xiao, Bing Yan, Zheng-Li Shi, and Peng Zhou. 2020. 'Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes', *Emerging Microbes & Infections*, 9: 386-89.

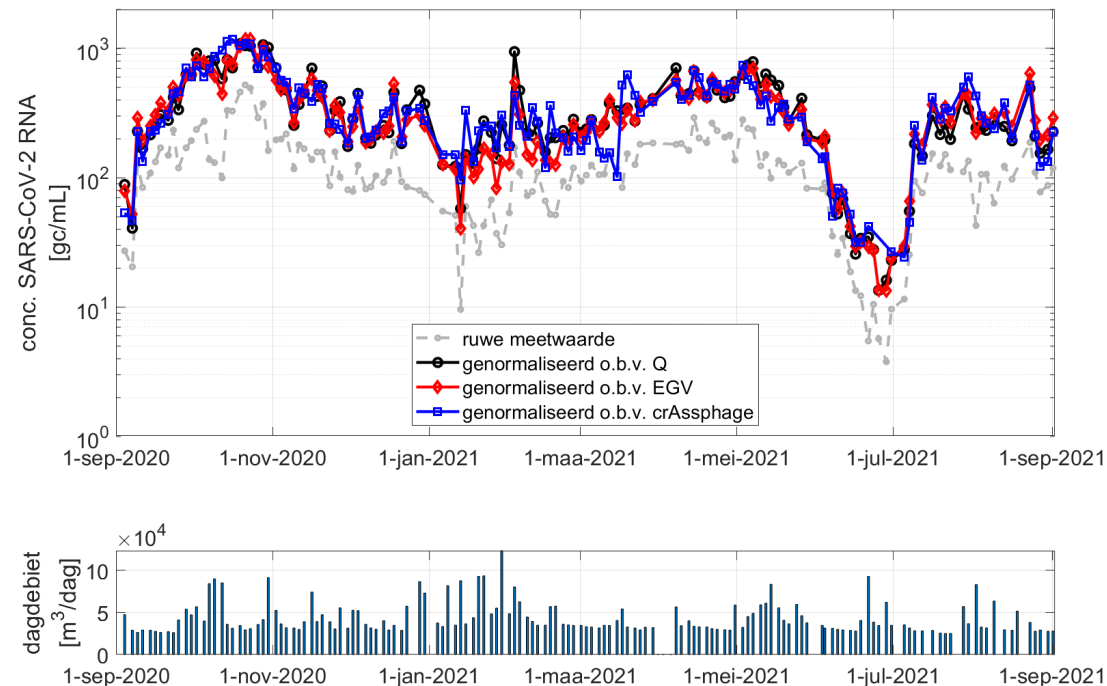
## BIJLAGE I

## NORMALISATIE SARS-COV-2

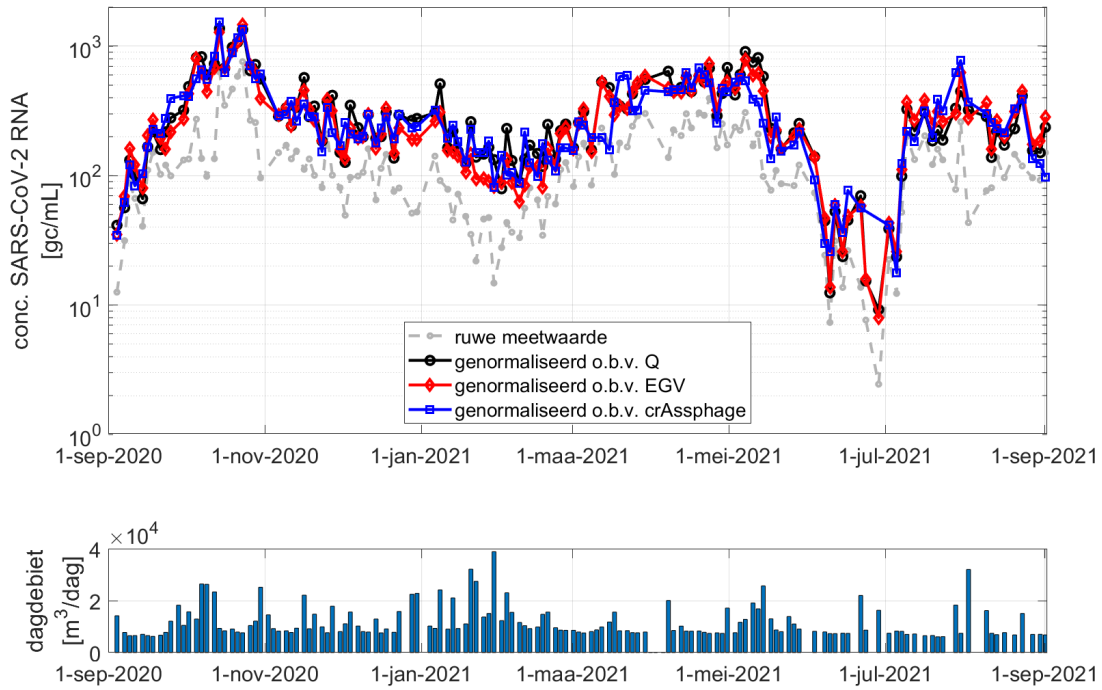
FIGUUR I.1 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RWZI DOKHAVEN INF2



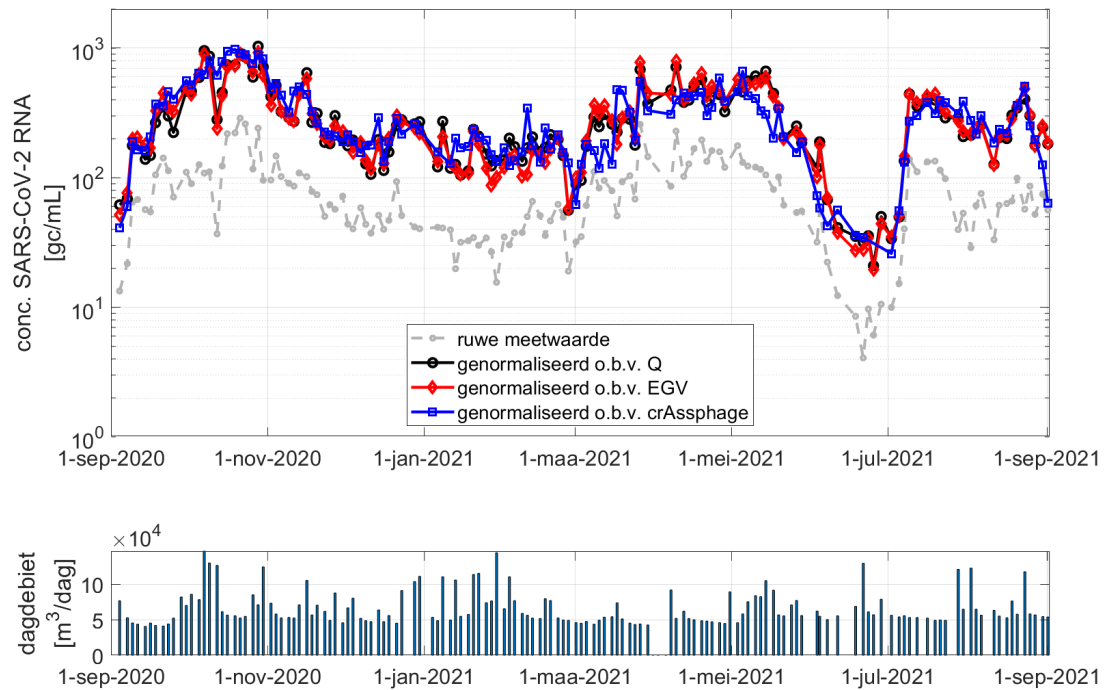
FIGUUR I.2 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RWZI DOKHAVEN INF3



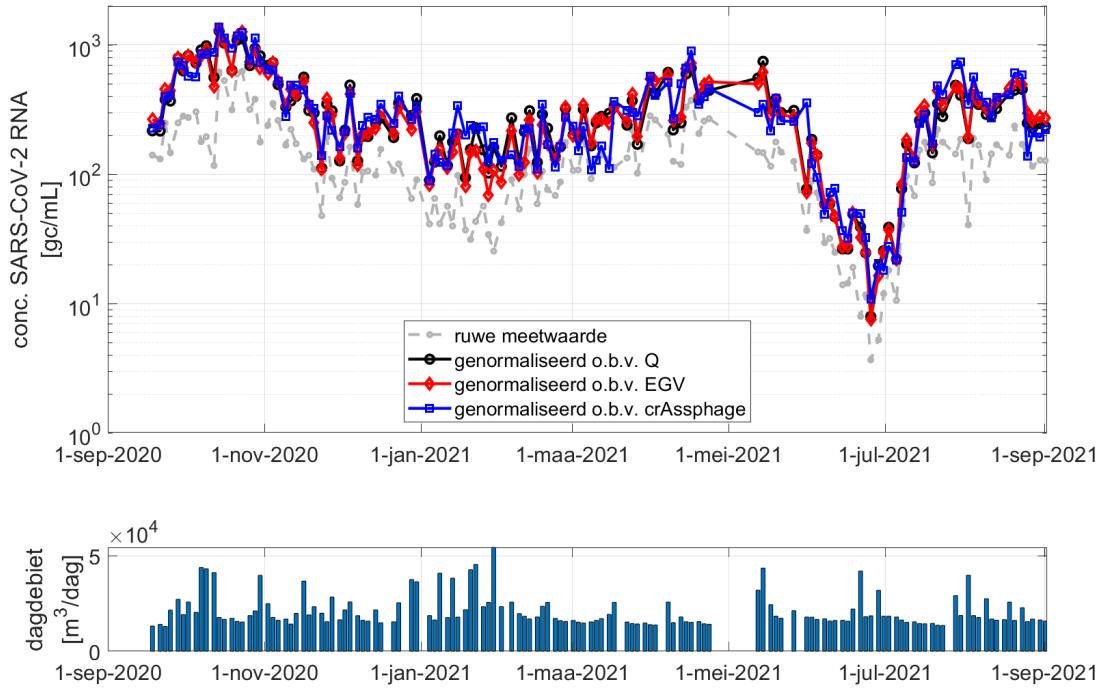
**FIGUUR I.3 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RWZI DOKHAVEN INF4**



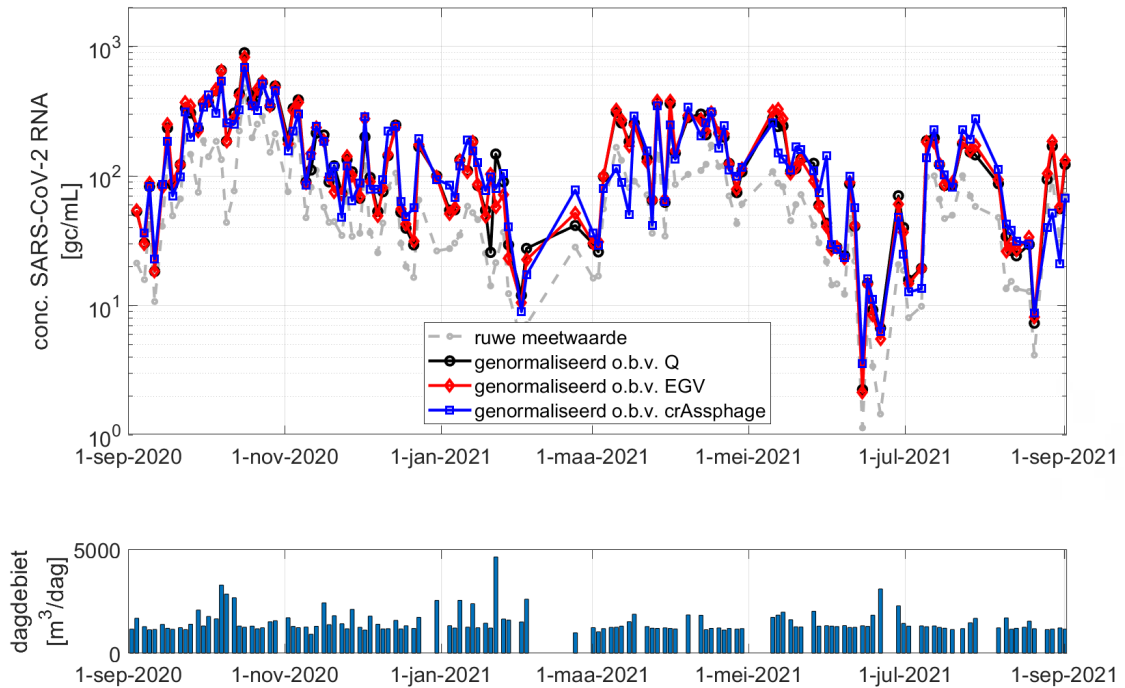
**FIGUUR I.4 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RWZI DOKHAVEN INF5-6**



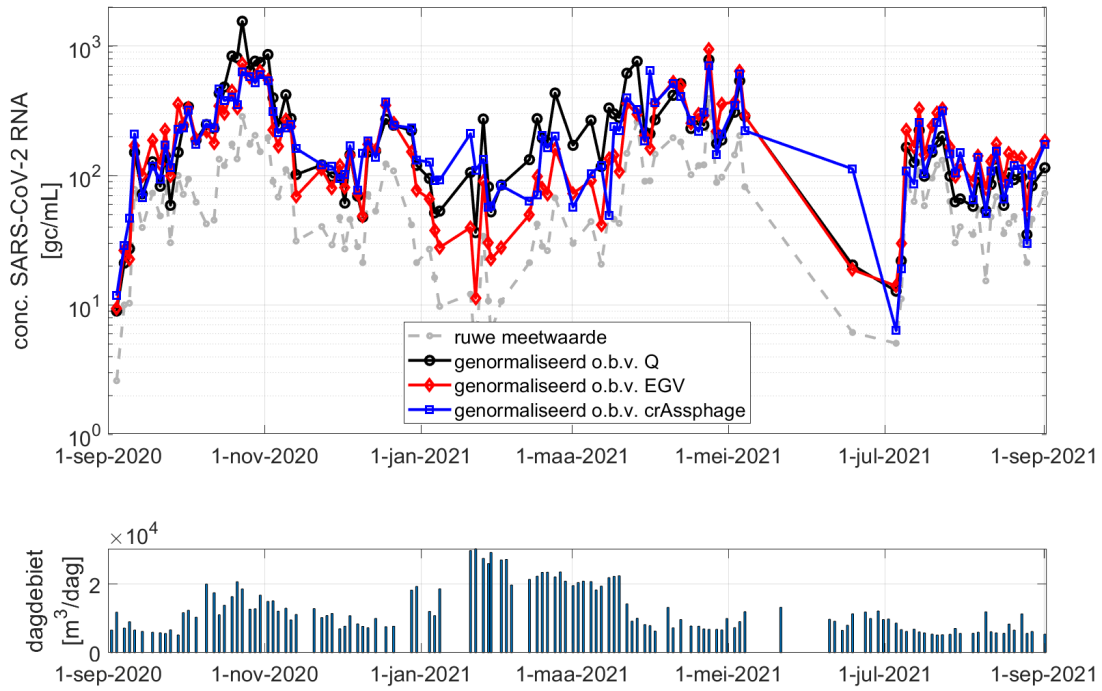
**FIGUUR I.5 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RG PRETORIALAAN**



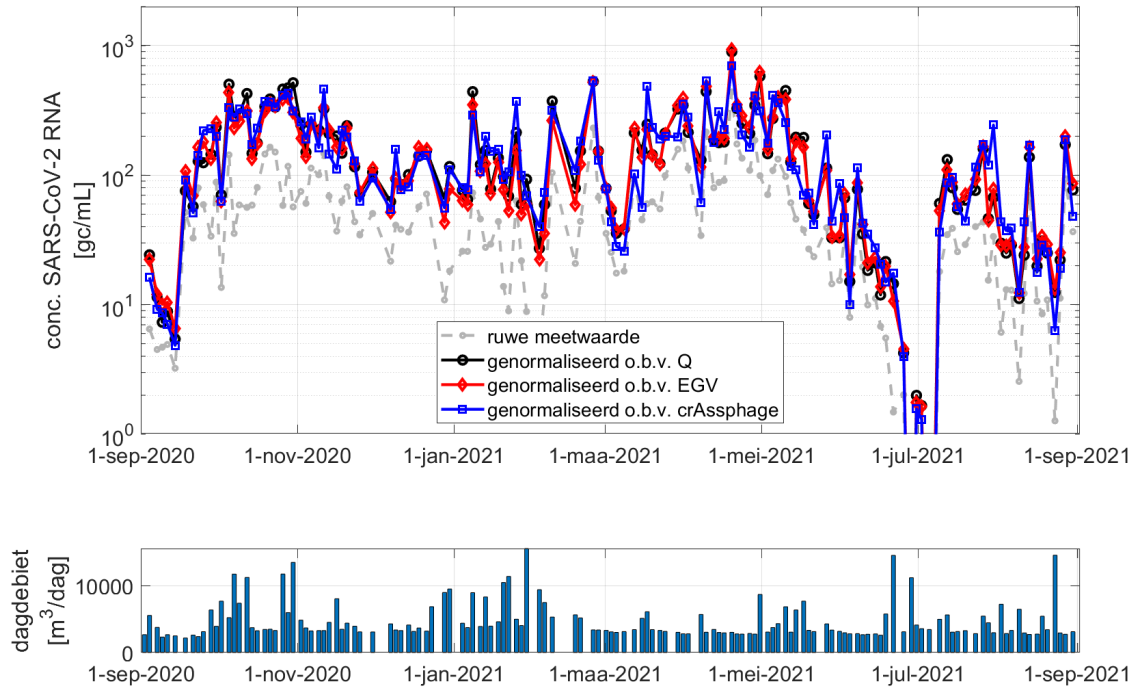
**FIGUUR I.6 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RG KATENDRECHT**



**FIGUUR I.7 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RG OMMOORD**

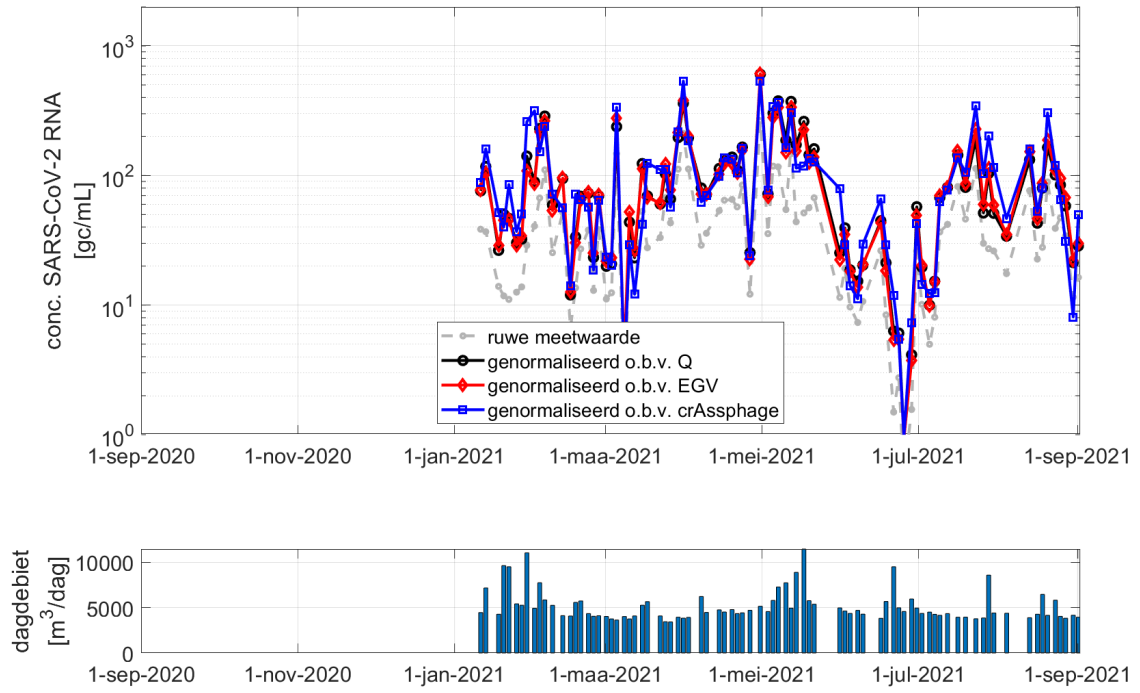


**FIGUUR I.8 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RWZI ROZENBURG**





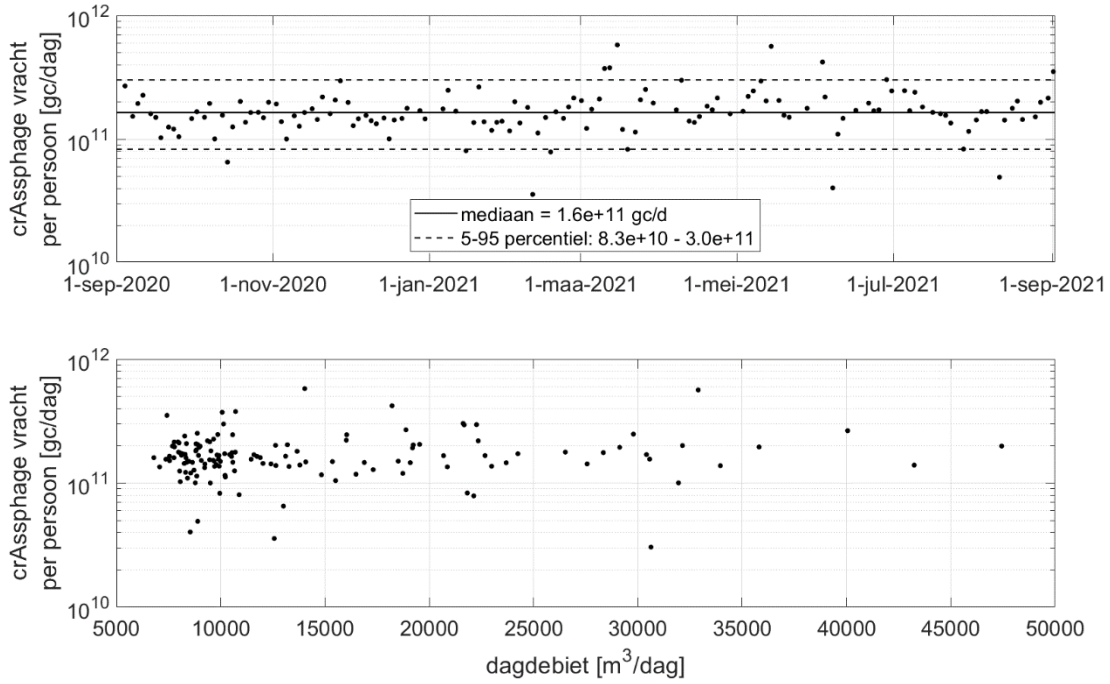
**FIGUUR I.9 SARS-COV-2 RNA CONCENTRATIE IN RIOOLWATER (RUWE MEETWAARDES EN DE GENORMALISEERDE MEETWAARDES) EN DAGDEBIET VOOR DEELSYSTEEM RG BERGSCHENHOEK**



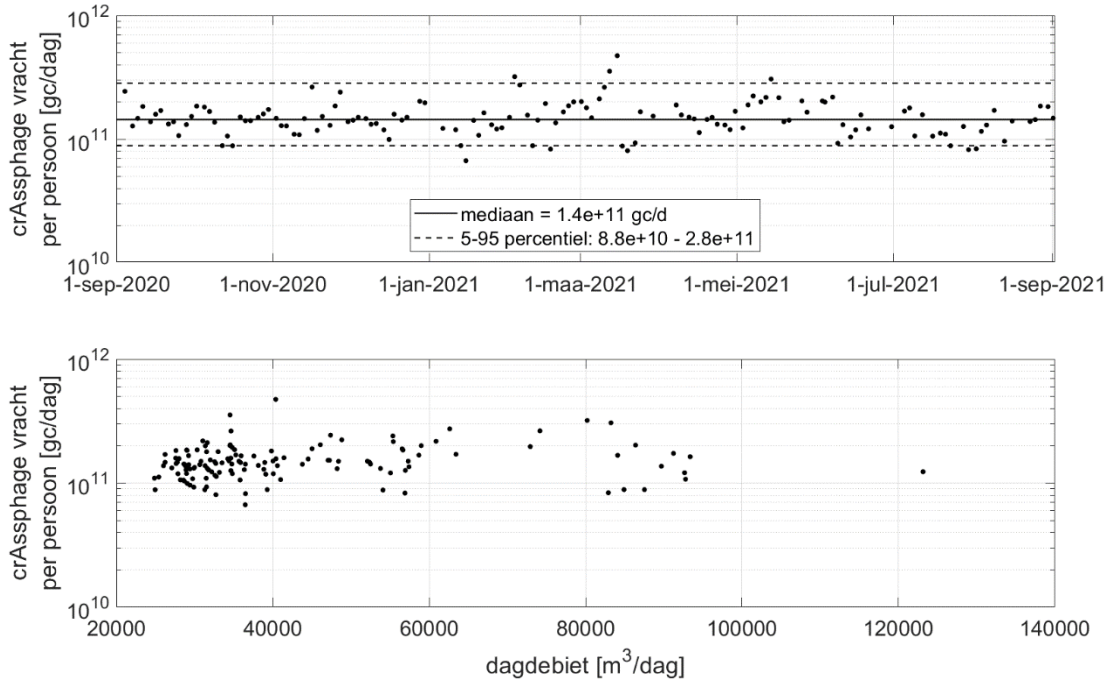
BIJLAGE II

# CRASSPHAGE VRACHT PER PERSOON PER DAG

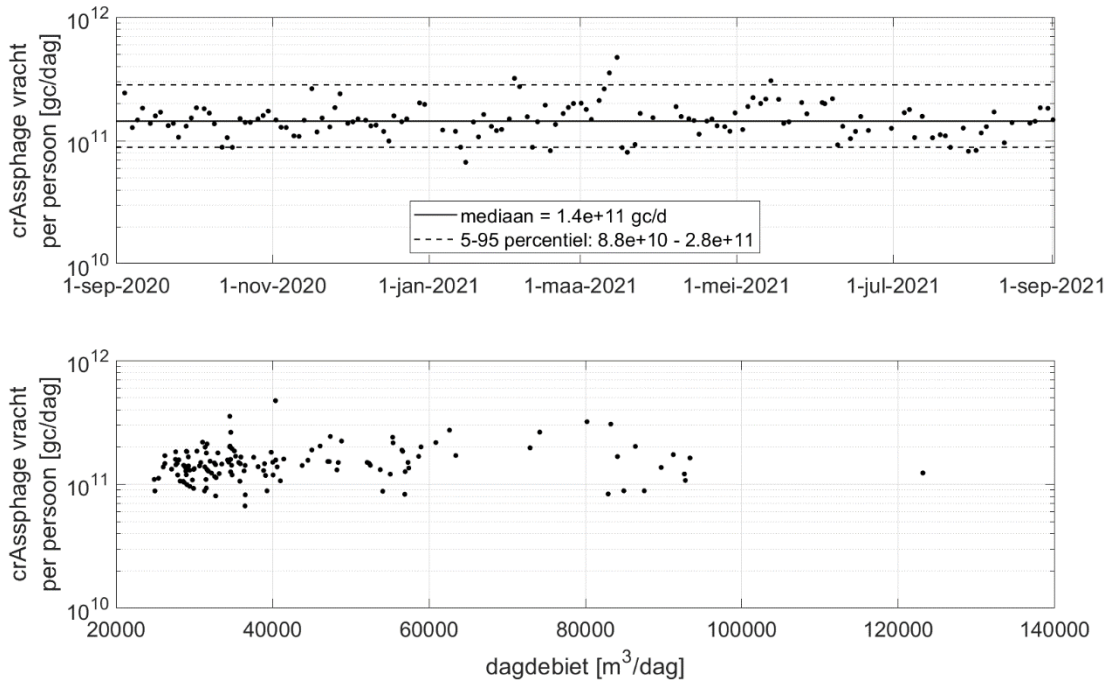
FIGUUR II.1 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RWZI DOKHAVEN INF2: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)



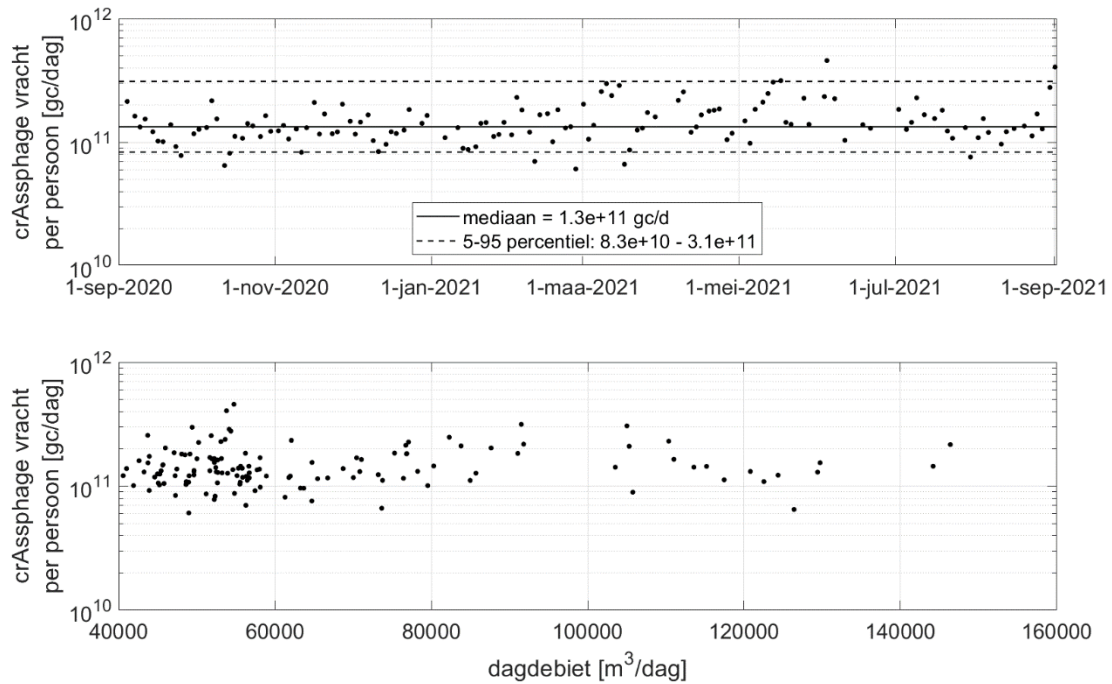
FIGUUR II.2 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RWZI DOKHAVEN INF3: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)



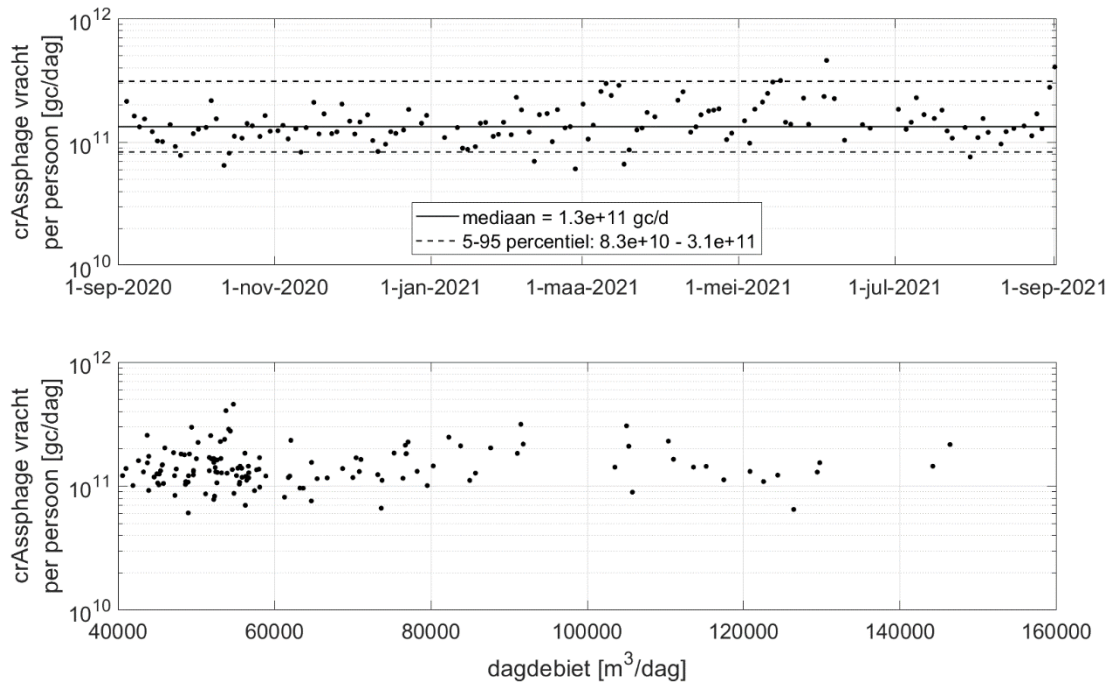
**FIGUUR II.3 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RWZI DOKHAVEN INF4: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)**



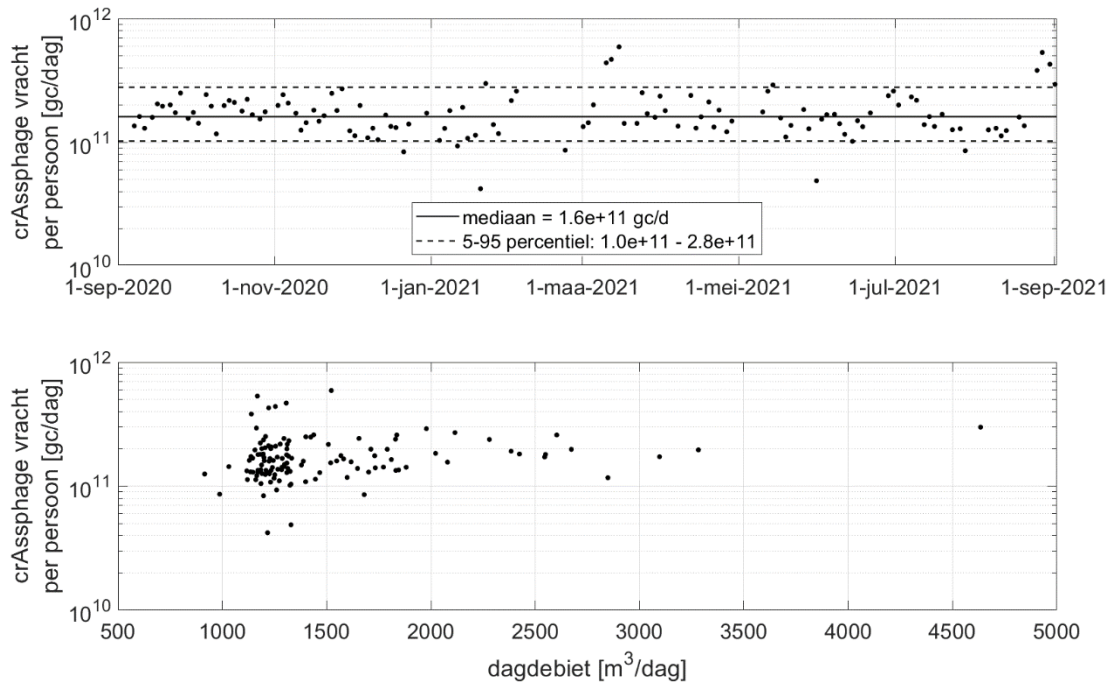
**FIGUUR II.4 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RWZI DOKHAVEN INF5-6: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)**



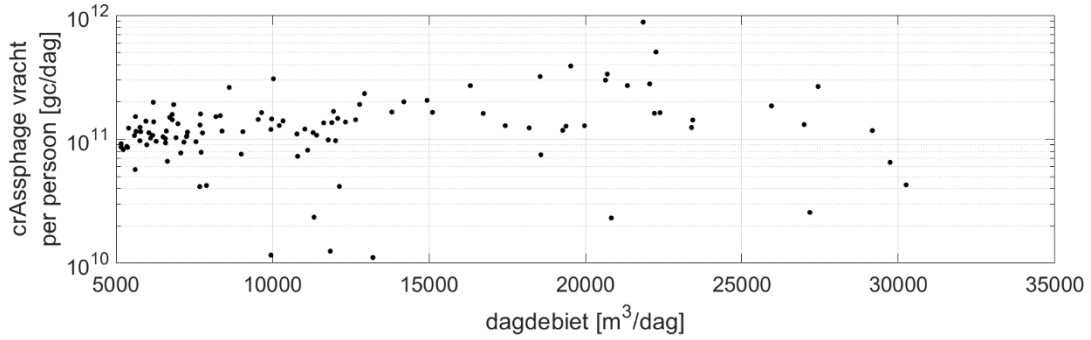
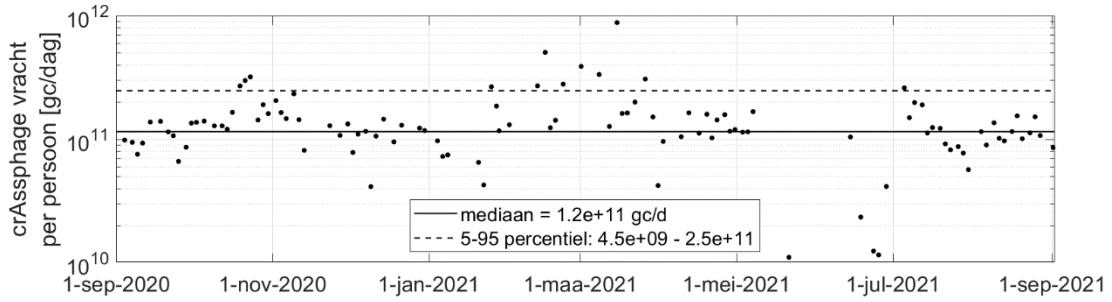
**FIGUUR II.5 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RG PRETORIALAAN: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)**



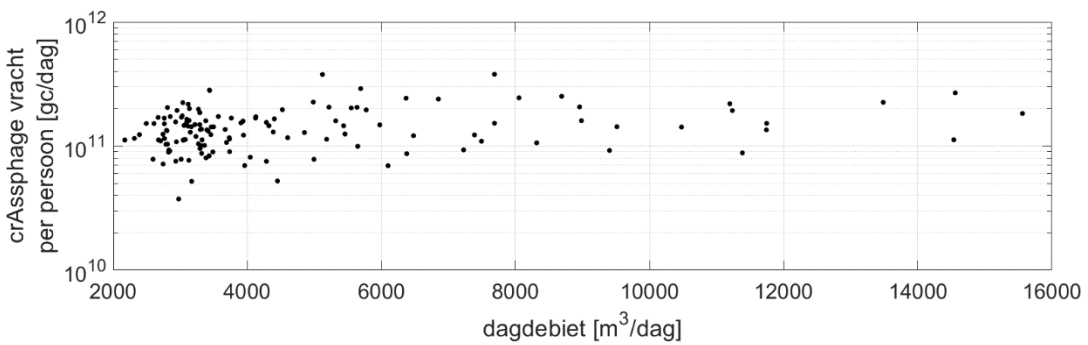
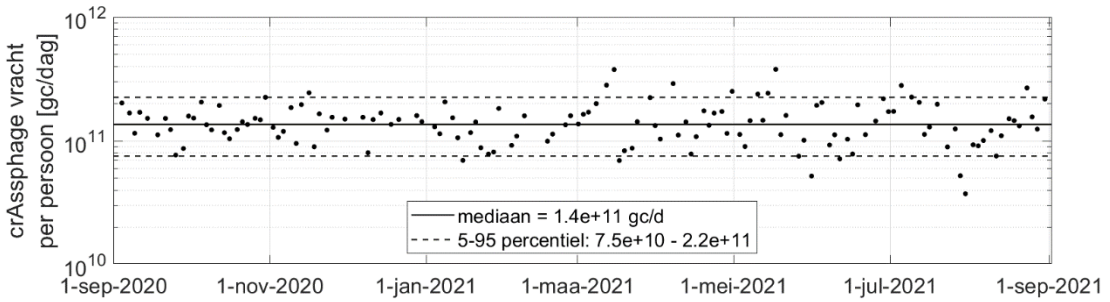
**FIGUUR II.6 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RG KATENDRECHT: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)**



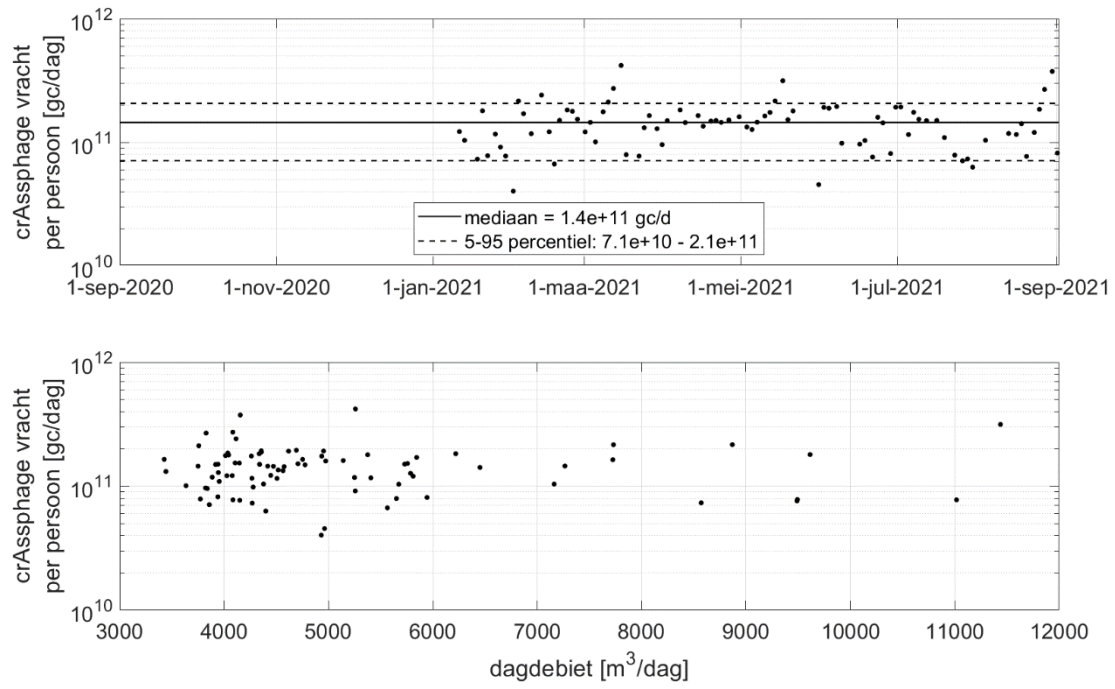
FIGUUR II.7 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RG OMMOORD



FIGUUR II.8 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RWZI ROZENBURG: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)



FIGUUR II.9 CRASSPHAGE DAGVRACHT PER PERSOON VOOR DEELGEBIED RG BERGSCHENHOEK: CHRONOLOGISCH (BOVEN) EN UITGEZET TEGEN DAGVOLUME RIOOLWATER (ONDER)

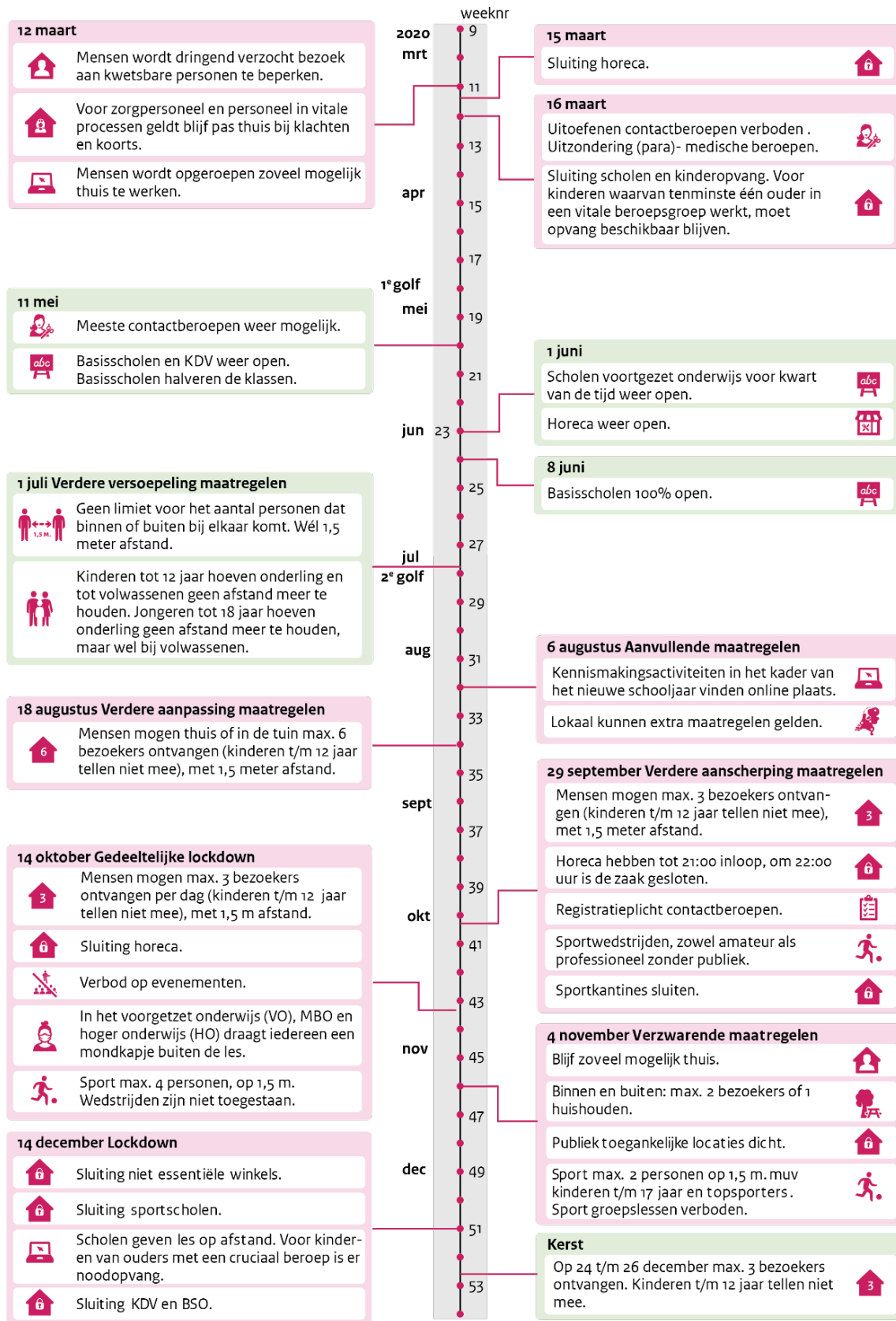


**BIJLAGE III**

# TIJDLIJN MAATREGELEN COVID

De figuren III.1, III.2 en III.3 tonen de tijdlijn van de coronamaatregelen voor de jaren 2020, 2021 en 2022. De figuren zijn afkomstig van <https://www.rivm.nl/gedragsonderzoek/tijdlijn-maatregelen-covid>

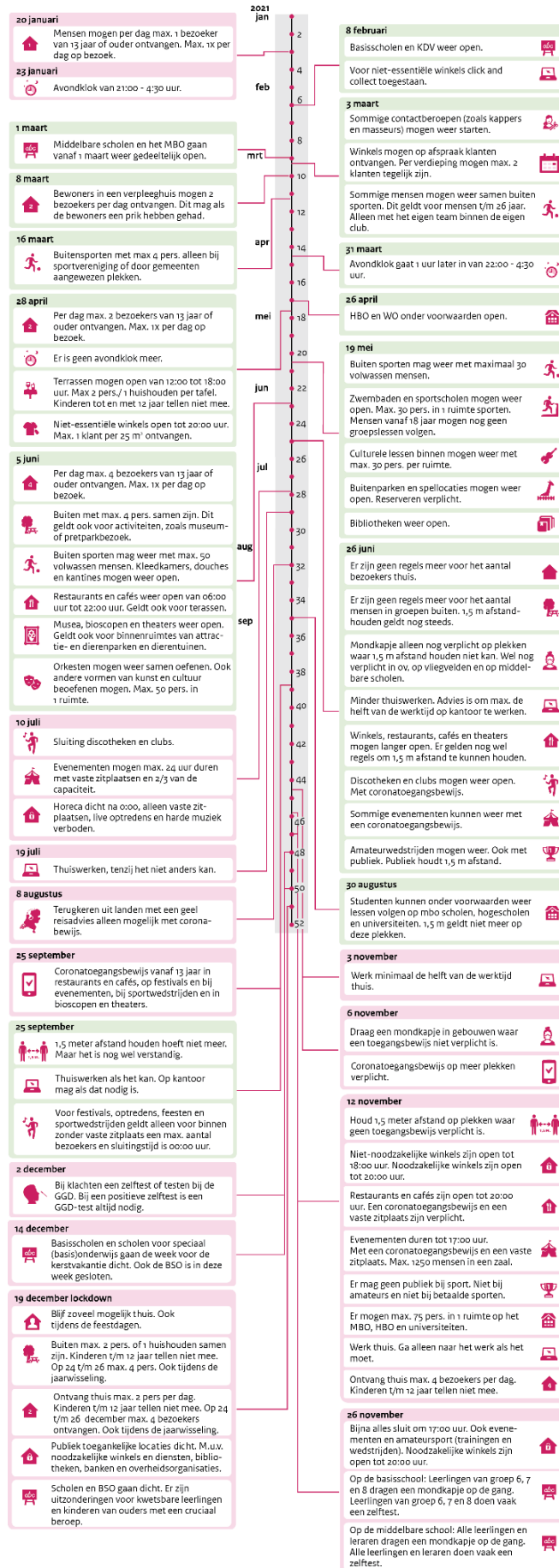
FIGUUR III.1 TIJDLIJN CORONAMAATREGELEN 2020





FIGUUR III.2

TIJDLIJN CORONAMAATREGELEN 2021



FIGUUR III.3 TIJDLIJN CORONAMAATREGELEN 2022

